

Ref. 7

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-291271

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)12月3日

C 12 N 15/31  
A 61 K 39/00

ZNA

J

8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全43頁)

⑮ 発明の名称 発現伝播体を有する組成物

⑯ 特 願 平1-165503

⑰ 出 願 平1(1989)6月29日

優先権主張 ⑱ 1988年6月29日 ⑲ 米国(US) ⑳ 213,248

⑳ 発 明 者 ダリル ファウルズ アメリカ合衆国、カリフォルニア州、ミルブレー、ヒルク  
レスト ブールバード 1345番地

㉑ 発 明 者 ウィリアム エツチ アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サン マテオ、ソア  
アンドリュース ソム ドライブ 708番地

㉒ 出 願 人 エム エル テクノロ アメリカ合衆国、ニューヨーク州 10281、ニューヨー  
ジー ベンチャーズ、 ク、ワールド ファイナンスシャル センターノース タワ  
エルビー ー 18階 番地なし

㉓ 代 理 人 弁理士 丹羽 宏之

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

発現伝播体を有する組成物

## 2. 特許請求の範囲

(1) 1種の発現伝播体より成る組成物であって、この発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列より成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を備えることを特徴とする発現伝播体を有する組成物。

(2) 発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列により成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体の74.5 kDa抗原、肺炎病原体の41 kDa抗原、肺炎病原体の36 kDa抗原、肺炎病原体の96 kDa抗原、および肺炎病原体の41 kDa抗原のうちのいずれか1種の抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を備えるこ

とを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を有する組成物。

(3) 発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列より成るとともに、前記タンパク質が、肺炎病原体の74.5 kDa抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を備えることを特徴とする請求項1または2記載の発現伝播体を有する組成物。

(4) 発現伝播体が、肺炎病原体74.5 kDa抗原に対するDNA配列の少なくとも一部分を含むとともに、このDNA配列が、アミノ酸配列を有する前記74.5 kDa抗原の少なくとも一部分のアミノ酸残物をVal<sup>11</sup>からCys<sup>17</sup>に変化させ、アミノ酸残物をVal<sup>11</sup>からArg<sup>17</sup>に変化させる突然変異を含むことを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(5) 発現伝播体が、肺炎病原体の74.5 kDa抗原に対するDNA配列の少なくとも一部分を

## 特開平2-291271(2)

包含すると共に、このDNA配列が突然変異を含み、アミノ酸残基T<sub>176</sub>に対するコドンTGAが、アミノ酸配列を有する前記74.5kDaの少なくとも一部において、TGGコドンに変換され、このTGGコドンもアミノ酸残基T<sub>176</sub>に対する遺伝暗号であることを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(6) 発現伝播体が、肺炎病原体の74.5kDa抗原に対するDNA配列の少なくとも一部を包含すると共に、その発現伝播体が、トリプトファンT<sub>176</sub>遺伝子に遺伝暗号付与する少なくとも5塩基に1組のDNA配列を有することを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(7) DNA配列内において、そのCys<sup>176</sup>がVal<sup>176</sup>によって置換され、Arg<sup>176</sup>がVal<sup>176</sup>によって置換されることを特徴とする請求項1から6までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

ブラスマ用の組換え形抗原に関する。さらに詳しくは、この発明は、マイコプラズマ性肺炎、特に豚のマイコプラズマ性肺炎を予防するためのワクチンに関する。

## (従来の技術)

肺炎マイコプラズマに起因する疾病は、世界中に発生しており、特にそれが豚の体内に発生する場合は、豚の呼吸の損失と深く係り合うことになる。一旦この病気にかかった動物は、産力低下、発育不良および病体となってしまうのみならず、日和見微生物による二次感染を受ける傾向が少なくない。

豚のマイコプラズマ性肺炎を予防するためのワクチンを開発する試みは、数多く行われて来たわが、これらのワクチンは何れも不成功に終っている状況である。

例えば、米国獣医研究通報(Am.J.Vet.Res.)第42号(1981)の第784頁に掲載されたとおり、クリステンセンおよびその共同者は、肺炎マイコプラズマの細胞を熱によって非活性化

(8) 発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列より成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体36kDa抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を備えることを特徴とする請求項1または2記載の発現伝播体を有する組成物。

(9) 肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体が、生物の体内において誘発されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を有する組成物。

(10) 前記タンパク質が、生成体によって発現されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を有する組成物。

(11) 肺炎病原体抗原が、予防疫補剤の成分として使用されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を有する組成物。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

この発明は、発現伝播体を有する組成物、例えば、肺炎病原体の抗原等に関し、特に肺炎マイコ

シ、これを豚に注射したが、マイコプラズマ性肺炎に対する予防効果があったことを認めている。

またエセリッジ(Etheridge)およびその共同者による、獣医学研究報(Res.Vet.Sci.)第33号(1982)の第188頁の記載によれば、生ワクチンが静脈内、皮下、あるいは腹腔内に注入された場合に、肺炎病原マイコプラズマによる定着を完全に防止することは不可能であることが認められている。

さらにロス(Ross)およびその共同者は、米国獣医学研究通報(Am.J.Vet.Res.)第48号(1984)の第1899頁において、注射法によって調製された肺炎マイコプラズマの排出物は、その予防作用が必ずしも一定しておらず、時によると、むしろ病気を拡大させることがあると述べている。さらに、ロス氏等の説明等によると、そのようなワクチンを市販に注射した場合、菌株VP-11を含有する病患の豚臓の10%懸濁液から採取した上澄液の400μと、同一の菌株の15

## 特開平2-291271(3)

乃至20分間を24時間培養したもの1mLとを組合せて成る気管内抗原疫学に対しては、或る程度の予防効果を与えたと説明されている。

(発明が解決しようとする課題)

前記のとおり、従来の肺炎病原体ワクチンでは、なお多くの欠点があったので、この発明は、これらの欠点を排除して、免疫性の高い接種を行うための抗原を含む組成物を得ることを目的とする。

(課題を解決するための手段)

この発明の1つの特徴としては、少なくとも1種の肺炎マイコプラズマ抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を有する少なくとも1種のタンパク質に暗号付与するDNA(デオキシリボ核酸)配列を含むところの、組換え形DNA分子、あるいは発現伝導体またはクローン化、伝導体(ベクターまたはプラスミド)を提供する。

また、この発明は、少なくとも1種のタンパク質を発現する機能を有するような発現伝導体に

よって形質転換されるところの宿主を提供する。

さらに、前記宿主によって発現される少なくとも1種のタンパク質を含有するワクチンを提供する。

要するに、前記のDNA配列は、少なくとも1種の肺炎マイコプラズマ抗原のエピトープを認識する1種の抗体を誘発する機能を有するところの、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号化するものである。好ましくは、この肺炎マイコプラズマ抗原は、改変の肺炎マイコプラズマ抗原、即ち、74、5、36、41、98、74、5の突然変異体、但し74、5のr116突然変異体には限定されない、および、前記抗原を暗号化するDNA配列の少なくとも1つのコドンが突然変異化されたところの74、5突然変異体、および分子量41キログルトン(以下kDaとする)の肺炎マイコプラズマ肺炎体抗原である。

このDNA配列から生成されるタンパク質が、

肺炎病原体抗原のエピトープを認識する1つの抗体を誘発する機能を有すると仮定すれば、このDNA配列は、全体として単一の抗原であるタンパク質に対して暗号付与ができるのみならず、その抗原の断片または誘導体のタンパク質、あるいは抗原または断片と、他のタンパク質との融合生成物であっても、それに対して遺伝暗号付与ができるのである。従って例えば、分子量74、5kDa(キログルトン)の抗原の断片が74、5kDaの抗原のエピトープ(抗原の構造を決定する決定基、1個または複数個)を認識する抗体を誘発する機能を有するならば、前記DNA配列は、この74、5kDaの抗原の断片である1種のタンパク質(即ち、43kDa(キログルトン)の分子量を有し、かつ74、5kDaの抗原ペプチド配列の部分を含むタンパク質)に対して遺伝暗号付与ができるのである。

同様に、抗原の誘導体が、例えば、ペプチド鎖内の1個または2個以上のアミノ酸の突然変異体であって、その誘導体が、上記の肺炎病原体の抗

原のエピトープを認識する抗体を誘発させる機能を有する限りにおいては、そのような誘導体であるタンパク質に対して、上記のDNA配列が暗号付与を行うことができるのである。

つぎに、(i)前記の肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘発させる機能を有する1種のタンパク質と、(ii)それ以外の1種のタンパク質との融合生成物のタンパク質に対しても、前記DNA配列が暗号付与を行うことができる。

要するに、「特に肺炎病原体用と指定された抗原のエピトープを認識するところの抗体を誘発させる機能を有するところの、1種のタンパク質に対する遺伝暗号を作成するDNAの配列」という用語の意味は、DNAの種々の配列が、形質転換された細胞内において、種々のタンパク質に対する遺伝暗号を付与し、要すれば発現することを意味し、そのタンパク質は適切な抗原であることは勿論、その断片または誘導体であってもよく、あるいは、この抗原とその断片または誘導体と、そ

## 特開平2-291271(4)

の他のタンパク質との融合生成物であってもよいということである。

また、1つの細胞内にベクターが導入された場合、そのベクター内に存在するDNA配列は、その配列によって暗号化されているタンパク質の一部のみを発現することができるものであるが、そのようなDNA配列もまた、発現されたタンパク質の一部が、肺炎病原体抗原の1種または2種以上の抗原のエピトープを認識する抗体を誘発することができるならば、そのDNA配列も前記の用途の範囲に含まれるものとする。

例えば、このDNA配列は、すべての抗原に対して暗号を付与することができるが、発現されるタンパク質は、その抗原の断片である。また、クローン化された伝播体が、2種以上の肺炎病原体抗原または断片に対して暗号化するDNAを含み得ることも理解できる。

適切なDNA配列であれば、広く種々のベクターあるいはプラスミドの何れにも含まれることができる。このようなベクターは、染色体および

非染色体の、および合成のDNA配列を含み、例えば、SV40の伝導体、細菌プラスミド、ファージDNA、酵母菌プラスミド、あるいは、プラスミドと、ファージDNA、ファルスのDNA(例えば牛痘、アデノウィルス、家畜痘、ウィルス、体細胞ウイルスなど)との組合せから求められたベクター、などである。

この適切なDNA配列は、種々の方法でベクター中に挿入することができる。一般に、このDNA配列は、従来周知の方法により、適切な制限酵素の位置に挿入される。これらの手法はいずれも、周知の範囲の技術と見なされる。

ベクター内におけるDNA配列は、或る適切な発現制御配列(プロモータ)と行動に連けられて、メッセンジャーRNA合成を支配する。かかるプロモータの代表的な例としては、次の各々を挙げることができる。即ち、LTRまたはSV40プロモータ、大腸菌(E. coli)のlacO(ラクトゼ)プロモータ、trpP(トリプトファン)、ファージラムダPLプロモータ、

および、原核細胞および真核細胞またはそれらのウィルス内の遺伝子の発現を制御するために知られている他のプロモータである。発現ベクターは、翻訳開始と転写終了のためのリボソーム結合位置をも含む。さらにベクターは、発現を増幅するための適切な配列を含むこともできる。

さらに、好ましくは発現ベクターは、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性の如き、あるいは、大腸菌内のテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性の如き、形質転換された宿主細胞を選択するための選択形質を与える遺伝子を含むことが望ましい。

前述のとおり適切なDNA配列ならびに適切なプロモータあるいは制御配列を含むベクターを使用すれば、或る適切な宿主の形質を転換させ、その宿主がタンパク質を発現するようにさせることができる。適切な宿主の代表的な実施を列挙すれば、大腸菌、わずらわす菌等の細菌細胞、酵母菌等のカビ細胞；CHOまたはバウス(Bowes)の黒色腫等の動物細胞；および植物細胞、そ

の他である。適切な宿主の選択は、この分野に精通する者にとっては容易になし得ることである。

前述のとおり、選択された細胞に挿入された適切なDNA配列を含む発現伝播体は、今問題の肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘発し得るタンパク質に対して暗号付けをする遺伝子の一部ではないところの、DNA配列または遺伝子配列を含むものでもよい。例えば、所望のDNA配列は、発現の助長、純粋化の改善、あるいは適切なタンパク質の発現を可能にしたり、免疫原性を改善するようなDNA配列に対して、同一の解読枠内において、融合させたものでもよい。

つぎに、ワクチンを開発しようとする場合、中和化抗体または感染防御抗体を、天然抗原の不連続で立体構造依存性のエピトープに向って狙いを定めることもできよう。それゆえ、組換え形発現系から得られたタンパク質は、自然抗原において、もとのタンパク質分子の3次元構造(立体構

## 特開平2-291271(5)

造)とは可成り異なった立体構造を有する可能性があることを考慮に入れておかねばならない。かくして遊離されたタンパク質の抗原性に依存して再生させて、適切な分子の立体構造を回復させることが必要となり得る。タンパク質の再生の方法は、科学文献中に多数見出されるが、その方法は1)アルカリ、カオトロパー、有機溶媒、およびイオン式界面活性剤等の試薬を使用して、不正規にからみ合ったタンパク質を変性(ぼく)したのち、希釈、透析、またはpH調整によって再生して、変性を除去し、2)タンパク質を脂質2重層即ちリポソームに再構成し、抗原性タンパク質の膜造のような膜を再構成するのである。

前述のとおり、或る場合には、クローン化伝播体に含まれるDNA配列が、或る特定の抗原に対して暗号づけをすることは、発見されたタンパク質は、その抗原の断片のみであるかも知れない。例えば、宿主宿主として大腸菌を使用した場合、コドンTGAは、大腸菌にとっては終止コドンであるから、クローン化伝播体内のDNA配列

が、アミノ酸トリプトファンに対するコドン、即ちTGAを含むならば、大腸菌はこのコドンを終止コドンと解釈するので、必ずしもすべての抗原が発現されるとは限らないわけである。

この発明は、2種のDNA配列から成る発現伝播体を提供するものであり、その一方(b)1種のマイコプラズマタンパク質に対する少くとも1種のDNA配列で、発現伝播体によって形質転換されるべき宿主によって、終止コドンと認識されるようなタンパク質の1つのアミノ酸に対する少くとも1つのコドンを有するものであり、他方は(b)1種の転換RNA(ヒ-RNA)を暗号づけして、そのヒ-RNAが、形質転換せらるべき宿主生物内の終止コドンに1種のアミノ酸を結合させ、そのアミノ酸を活性マイコプラズマタンパク質内に挿入するようにさせるDNA配列である。これによって、タンパク質合成が早期に終了することが防止される。

このヒ-RNAは、1つの発現伝播体内に含まれているDNA配列を有し、このヒ-RNAは、

問題のコドンによって暗号づけされた同じアミノ酸をマイコプラズマ中に挿入するところのヒ-RNAであっても、または、他の異なる1種のアミノ酸を挿入するヒ-RNAであってもよい。

かくして例えば、追加のDNA配列が、1つのヒ-RNAトリプトファンを暗号づけしてもよい。このヒ-RNAは、形質転換された宿主内の終止コドンに対して結合させ、アミノ酸トリプトファンを、合成されつつあるマイクロプラズマタンパク質内に挿入するものである。

あるいは、この追加のDNA配列が1つのヒ-RNAを暗号づけし、このヒ-RNAが形質転換された宿主内の終止コドンに対して結合させ、発見されたタンパク質内のアミノ酸トリプトファンの代りに、異なるアミノ酸、例えばチロシン、フェニルアラニン、またはイソロイシンを採用してもよい。

かくして例えば、発現伝播体中に追加のDNAを使用することは、TGAの終止コドンに結合するヒ-RNAトリプトファンを宿主生物内で暗号

づけするところの、例えばトリプトファン(ヒrp)176またはヒrp178等のヒrp遺伝子を暗号付けするものであって、これによってトリプトファンを挿入し、それによって、コドンTGA(これはマイコプラズマ内のアミノ酸トリプトファンに対して暗号づけする)を含むところのマイコプラズマタンパク質の合成が早期に終了しないようにするものである。かつ、発見された組換え形マイコプラズマタンパク質は、上記のTGAコドンによって暗号付けされたトリプトファンを含むものである。

上記の追加のDNAが、トリプトファン以外の或るアミノ酸に対するヒ-RNAの1つの変異体に対して暗号付けするならば、つまり例えば、TGAコドンに対して結合して、チロシン、イソロイシン、あるいはフェニルアラニンのいずれかを挿入させるところの、トリプトファンヒ-RNA遺伝子またはイソロイシンヒ-RNA遺伝子あるいはフェニルアラニンT遺伝子に対して暗号づけするならば、発見されたマイコプラズマタ

## 特開平2-291271(6)

ンパク質内で、マイコプラズマ中で合成されるタンパク質中に普通に存在するトリプトファンの代りに、追加のDNAによって暗号づけられるt-RNAに相当する1つのアミノ酸が採用されるわけである。

1つの実施例としては、コドンTGAを終止コドンとして認識する生物（例えば大腸菌）を形質転換させるために使用されるクローン化伝播体は、DNA配列の一部として1つのTGAコドンを有する所望の肺炎病原体タンパク質に対して暗号付けずるところのDNA配列も含まれることが望ましい。なおその他に、宿主生体内でコドンTGAに対して結合されて、形質転換される生体内で生成される肺炎病原体のタンパク質連鎖の内部へ、トリプトファンを挿入するところのt-RNAに対して暗号付けをするような、1つのDNA配列を追加して包含させることができる。例えば、trpT176遺伝子に対して暗号付けする1つのDNA配列を1つのTGAコドンを有するDNA配列を有するクローン化伝播体中へ挿入するこ

ともできる。このDNA配列は、所望の肺炎病原体タンパク質に対して暗号付けし、大腸菌内でクローン化伝播体を使用して、トリプトファンを含む所望の肺炎病原体タンパク質を発現させるものである。かくして例えば前述の第3の実施例に示すとおり、分子量74.5 kDaの肺炎病原体抗原に対して暗号付けするDNA配列と、trpT176遺伝子を暗号付けするDNA配列とを含有するクローン化伝播体によって、大腸菌を形質転換すれば、74.5 kDaの肺炎病原体抗原を、大腸菌内で発現させることができる。また第1の実施例のように、74.5 kDaの病原体抗原に対して暗号付けするDNA配列を含有するが、trpT176遺伝子に対して暗号付けするDNA配列は含有しないところのクローン化伝播体を使用して、大腸菌を形質転換すると、74.5 kDaの肺炎病原体抗原の断片を発現させることになる。

また、この発明によれば、1種のマイコプラズマタンパク質に対する少くとも1つのDNA配列

を含む発現伝播体を提供する。この少くとも1種のDNA配列は、発現伝播体によって形質転換されるべき宿主生体によって、終止コドンであると認識されるようなタンパク質の1種のアミノ酸に対する少くとも1種のコドンを含む、1種のマイコプラズマタンパク質に対する、少くとも1種のDNA配列から形成されたものである。さらに、この少くとも1種類の終止コドンは、前記アミノ酸に対して暗号付けする他の1つのコードに突然変異されており、この変異されたコドンは、宿主生体によって終止コドンとして認識されないものである。このように1つのコドンから、終止コドンとして認識されないコドンに変換されることにより、タンパク質合成が早目に終結することを防止することができる。

例えば、74.5 kDa抗原の211位置にあるアミノ酸は、TGAと暗号付けされていて、通常これはトリプトファンに対する暗号であると共に、大腸菌はこれを終止コドンと認識する。TGAコドンを含むオリゴヌクレオチドは、例え

ば部位指向変異体などの突然変異によって変異するので、TGAコドンはTGGコドンに変換され、このTGGもトリプトファンに対する暗号である。つぎにこのオリゴヌクレオチド配列が置換されて、対応するTGAコドンを含む74.5 kDa抗原の遺伝子のDNA配列の一部となる。かくして、宿主生体内のTGAコドンに対して適合するt-RNAに対して暗号付けするような追加のDNA配列を必要としないで、74.5 kDa抗原の全長を発現するところの、発現伝播体を生成することができる。

この発明は、さらに、少くとも1種のマイコプラズマタンパク質について暗号付けする少くとも1種のDNA配列を含む発現伝播体を提供し、タンパク質合成の終結を防止する。この少くとも1種のDNA配列は、マイコプラズマタンパク質の第1のアミノ酸を暗号付けする少くとも1つのコドンを有する少くとも1つのDNA配列から形成されたものである。この少くとも1つのコドンは、第1のアミノ酸とは異なる1種または2種以

特開平2-291271(7)

上のアミノ酸を暗号付けする、少なくとも1つのコドンへ突然変異されたものである。或る1つの発現伝播体のDNA配列には、1種のアミノ酸に対する1個以上のコドンを変異させることによって形成された1個または複数のコドンを含むことができるが、前記のコドンは、宿主生体によって終止コドンとして認識されるものであり、これが変異されて新しいアミノ酸に対するコドンとして、終止コドンとして認識されない別のコドンとなる。あるいは、1つの発現伝播体には、前記の少なくとも1種のDNA配列に追加して、形質転換されるべき宿主生体内の終止コドンに対して結合するところの1つのローRNAを暗号付けする、少なくとも1種のDNA配列を含むことができる。このような終止コドンが存在し、活性マイコプラズマタンパク質内へ1種のアミノ酸を挿入するならば、タンパク質合成の早期中断は防止される。

このような組換え変成の実例は、74、5 kDa抗原のr116変成であり、以下に述べる

であり、後述する。

この発明によれば、前記説明の形式のクローン化伝播体によって形質転換された宿主から生成されるタンパク質を、生理学的に許容しうる伝播体と関連させることにより、家豚の肺炎病原体に対する予防が可能となる。前記の指摘のとおり、このようなタンパク質は、前記肺炎病原体の1種または複数の抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する機能を有する。このような発現されたタンパク質は、以下の説明中では「組換え形病原体抗原」と称することもあるが、前述のとおり、タンパク質が同時に断片や誘導体または融合生成物として含まれるような肺炎病原体抗原と同一のタンパク質ではない。「組換え形病原体抗原」という用語は、断片、誘導体あるいは融合生成物を含むものである。

組換え形肺炎病原体抗原は、肺炎病原体に対する予防効果を達成する量においてワクチン内に混入される。一般にワクチンの1回処方量は、少なくとも5マイクログラムの組換え形肺炎病原体抗原

ように大腸菌によって実現される。

74、5 kDa抗原と大腸菌dnaKタンパク質との間には、可成りの配列相関が見られた。特に指摘されるアミノ酸中の相違点は、74、5 kDaの肺炎病原体抗原の17と27位置におけるバリン残基が、大腸菌dnaKタンパク質と比較して、抗原のこれらの区域における予測されたT細胞認識特性を著しく低減させる点である。このようなタンパク質分岐は、免疫系に対する抗原の有効な搬出と深い関連性が見られ、部位指向形突然変異誘発を使用すれば、17と27の位置におけるバリンは、それぞれシステインとアルロニンによって置換させることができる。この2つの置換で、大腸菌dnaKタンパク質中に存在すると予測される柱状ラセン構造の2つの領域を再生させる。この2種のアミノ酸残基置換を含む誘導体に対する1個または複数の遺伝子は、大腸菌発現ベクター中へ移行させることができる。発現された組換え形タンパク質の実例は、74、5 kDaの大腸菌抗原のr116変異体として既知

(以下、「病原体抗原」とする)を含有する必要があるが、好ましくは100マイクログラムの病原体抗原を含有する方がよい。多くの場合、20ミリグラム以上の量のワクチン中でも、前記の必要量の病原体抗原を含有していないのが通例である。

肺炎病原体に対するワクチンに対して、「予防」または「予防する」という用語を使用する場合、それは、ワクチンが、家豚の肺炎病原体を駆逐すること、あるいはその肺炎症状の重症を軽減することを意味する場合と、その両者を意味する意味にも使用する。

複数の処方が行われるときは、一般に8週間の間に3種以上の処方を行ってはならない。

組換え形肺炎病原体抗原との関連において使用される伝播体は、種々の伝播体のうちの何れか1種が使用される。適切な相持体の各実例としては、ワクチン用の重油油、明ばん、合成高分子等の相持体が周知であり、適切な相持体の選択は、当業者にとって容易である。その選択は、ワクチ

## 特開平2-291271(8)

ンの投与の方式によっても左右される。ワクチンは、注射用の処方でもよく、または筋肉下、静脈内、腹腔内、あるいは皮下注射によっても行われる。または、ワクチンは、食物または水と混合しての経口投与、または錠剤形とする事も可能である。

その他種々の投与方式が考案られるが、この発明においては、特定の投与方式に限定されない。

またワクチンには、病原体抗原のまたはその断片の他に、活性成分その他の補助剤が添加されることは、前述のとおりである。

またこの発明によれば、前記説明の形の肺炎病原体キリバク菌抗原の1種を、特異な結合体として使用することにより、肺炎病原体抗原に対抗する抗体を検出し、判定することが可能となる。

換言すれば、肺炎病原体抗体用の免疫検定法であって、その検定法中には、病原体抗原が結合体として使用され、特異的に病原体抗体を結合させるようにする方法である。

この検定法では、サンドイッチ形の検定器を使

用するのがよく、病原体抗原がバインダとして固体支持体に支持され、試料内にある病原体の特異の抗体と、結合された抗体とを結合させ、適切なトレーサで判定されるものである。

このトレーサは、溶解可能なラベルを付着したリガンドより成る。リガンドは、病原体抗体によって免疫学的に結合された形のリガンドで、このリガンドは通知の方法でラベル付けすることができる。

固体支持器上の病原体抗原に対して結合される病原体抗体は、例えば、1つの適切な溶解可能なラベルで標示された病原体抗体用の1つの抗体を使用することによって判別される。

このサンドイッチ式検定法では、病原体抗体に対してラベル付された抗体、単クローン化抗体でも、多クローン化抗体でもよい。例えば多クローン化抗体は、凝集剤のグロブリン1と2でもよく、または特に肺炎病原体に対して用意された1つの抗体であればよく、これは通常の手法で生成されたものでよい。例えば、肺炎病原体抗体

を適切な動物に注射して得られる。

溶解形ラベルは、酵素、放射性ラベル、色原体(ゲイ光染料または吸光染料でもよい)その他の内から適宜に選択できる。ラベルの選定は周知の技術に属する。

抗体の固体保持器も、種々の固体保持器の中から適宜選択でき、その選定も周知の技術と見なされる。例えばマイクロ滴定板、管、粒子等があるが、この発明ではいずれにも限定はしない。抗原は通常の方法で支持され、例えばコーティング、共有結合体等である。その選定も通常の技術と見なされる。

サンドイッチ形検定器は、種々の方法で運行でき、例えば「前進」、「後進」または「同時」があるが、前進法が最適である。

代表的な手法では、固体支持器に支持された病原体抗原を、まず病原体抗体を含むと想定されるサンプルに接触させて、サンプル中に存在するいずれか特定の抗体を、支持体上の抗原に結合させる。

固定支持器を洗浄したのち、病原体抗体に結合するトレーサに支持器を接触させる。抗体がサンプル中に存在すれば、トレーサは、固体支持器上の抗原に結合された抗体に結合されるようになり、支持器上のトレーサの存在が、サンプル中に病原体抗体が存在することを示す。トレーサの存在は、周知の手順で溶解形ラベルの存在を判別することによって判断される。

サンドイッチ形検定法が最適ではあるが、病原体抗原の検定は他の方法もある。例えば、膠着検定法では、抗原がラテックス粒子などの固体粒子上において使用される。

また、この発明は、病原体抗体は前記と同様に支持して、トレーサがリガンド(配位子)と溶解ラベルより成る検定法、即ち1組の試薬キットとした検定法を提供する。トレーサのリガンドは、病原体に結合されている。試薬は、適宜なキット即ち試薬パッケージに収納され、さらに緩衝剤等の他の成分を含ませることができる。病原体抗原は、固体支持器に支持させる方がよい。



## (作用)

この発明の発現伝播体のDNA配列により、少くとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号を付与し、このタンパク質が病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘発する効果を生ずる。

またこの発現伝播体により、宿主生物の形質転換を可能とする。

さらに、前記宿主によつて発現される少くとも1種のタンパク質を含有する予防ワクチンの製造を可能ならしめる効果がある。

## (実施例)

以下、この発明の実施例を図面を参照して説明する。下記の各実施例においては、特に規定しない限り、培養、増殖、および遺伝活性化は、マニフエス他によりコールドスプリングハーバー研究所発行の「分子クローニング法と研究室手引」(1982)中に記載の方法による。また、形質転換は、コーエン他によるPNAS 69, 2110 (1973)中に記載の方法による。

また、特に規定しない限り、下記実施例中で使

用される肺炎病原体(肺炎ハイオマイコプラズマ)抗原は、1988年9月28日発行のヨーロッパ特許出願第283,840号明細書中に記載の肺炎病原体から得られたものである。

## (実施例1)

肺炎病原体DNAの7.5, 5 kbの遺伝体抗原の調製

菌株P-57223(バーデョ文字チャールズアームストロング博士より入手)を、12のフリース培养基中で育成し、1ml当りの湿重単位で約 $10^8 \sim 10^9$ の密度となった。細胞は遠心分離によつて採取され、洗浄後3.25mlを与え、2mlのリン酸で緩衝した氷塩水中に再懸濁された。この懸濁液を、19.75ml 10mM Tris pH 8.0 1mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)中に溶解した24.53gの塩化セシウムより成る溶液と混合し、これに10mg/mlの品化エチジウムを添加した。これを2.15mlの10mM Tris pH 8.0と、1mlのEDTAと、9.9%の

25分後、42分後、および63分後において、250μlの部分標本を採取した。

これらの部分的に熱成された病原体DNAの4種の試料を、混合して(200μg)、指数関数式シグモイド法で処理した。この勾配液を、ソールバルAH627ロータを使用して25,000rpmで15分で21時間遠心分離させた。

この勾配液を、15滴分画することにより、器底から徐々に分画した(総計90分画量)。各分画量の20μlずつを、前記のとおり、1%の悪天ゲル中に分散させた。18kbp(キロベース)より小さく15kbpより大きいDNAの断片を含む分画液を採取し(32~40分画量)、TE (10mM Tris HCl pH 7.5に1mM EDTAを添加してpH 8.0としたもの)に対して遠析して、シグモイド分画を除去した。つぎにDNA(3.5ml)を、エタノールで沈殿させ、約15μlまで懸濁させて(1mg/ml)、-20℃で保存した。

伝伝子ライブラリーの作製

肺炎病原体P-57223の200μgの遺伝子DNAの予備熱成を、1ml当り200単位の制限酵素EcoRIを使用して行い、8分後、

## 特開平2-291271 (10)

バクテリオファージ・ラムダダッシュのEcoR I (制限酵素)の酶が、ベクタークローン化装置(ストラダジン社製)によって得られ、このEcoR I 酶は、濃度100単位/mgにおいて、T<sub>4</sub>リガーゼ(通称活性剤、ペーリングーGmbH社製)を使用して、容積10μl中に25μg/mgの濃度にあるマイコプラズマ細胞のDNAに対して、200μg/mgの濃度で通称処理した。この通称反応を、常温で2時間実施させた。反応液の4μlを、試験管内封入形キャット「ギガバック」(ストラダジン社製)を使用して、ラムダ粒子内へ封入した。次にこのファージを、大腸菌の菌株P23393(ストレイタジ社製)上に感染し、7.75×10<sup>8</sup> p.f.u./mgの量(ラムダダッシュの3.1×10<sup>8</sup> p.f.u./mgに相当する)が定量化された。

## 免疫血清

1. 兔の免疫決定。ニュージーランド産白色種兔を、完全フロイント補強(セントルイス市シグマ社製)中で、肺炎病原体菌種J(ATCC 2

5 kDaの抗原を採取した。1-Dウェスタン法プロット分析によれば、単一のマイコプラズマ74.5 kDaタンパク質帯に反応する過剰免疫性血清と、また2-Dゲルウェスタン・プロット分析によれば、2種のタンパク質に反応する過剰免疫性血清が認められた。この74.5 kDa抗原は、日本国特願昭63-25847号に記載された方法によって調製され、この特願昭を、現出願の一環として引用するものとする。

3. 家豚の免疫血清

バーデューの小形家豚に、完全フロイント補強中に混入させた、100μgの電気泳動純化74.5 kDa抗原によって、免疫性を付与した。第1回の注射から2週間後に、同一の注射を行った。1-Dおよび2-Dゲルウェスタン・プロット分析により、単一のマイコプラズマの74.5 kDaのタンパク質に反応する過剰免疫性血清が認められた。このタンパク質は、過剰免疫性のマウス血清によって認識される2種の内の一方のものと同一のタンパク質である。これらの

5934)の約10<sup>11</sup>染色単位量を使用して免疫性を付与した。第1回の注射の2週間後に、完全フロイント補強(シグマ社)中に混入した同じ抗原の補助注射を行った。過剰免疫性血清が、30種以上のマイコプラズマタンパク質に対して反応することが、1-Dゲルウェスタン法分析によって判明し、2-Dウェスタン法分析によれば、分子量約74.5 kDa(キロダルトン)の2種のタンパク質に対して反応することが判明した。

2. マウスの免疫血清

前記と同様な方法で、単一種の血清を調製したが、下記の点では相違する。即ち、菌株P-57223(バーデュー大子C、アームストロング博士提供)から電気泳動法による約10μgの分子量74.5 kDa(キロダルトン)の純良抗原によって、DBA/2のマウス(はつかねずみ)に免疫付与し、さらに同一抗原量で補助免疫を行った。1988年9月26日発行の日本国特願昭63-258427号記載の方法により、74.

家豚は、ワクチン投与によるマイコプラズマ性肺炎からの予防の一つの目安となった。

遺伝子ライブラリーのスクリーニング

ライブラリーは、兔の肺炎病原体(これは、他のマイコプラズマ表面タンパク質の他の分子量74.5 kDaの抗原をも免疫学的に認識する)によって送りわけられた。約200種の遺伝子組換え体が、兔の免疫血清に対して免疫学的に反応したので、これら約200種が第1次選別によって選択された。これらの組換え体は、電気泳動法によって精製された抗原に対して生成された、マウスの対74.5 kDaタンパク質によってさらに選別された。10種の組換え体が、大腸菌内で単一種の血清と免疫学的に交差反応する物質を生成することが認められ、この10種の組換え体が選択された。

分子量74.5 kDa抗原に対する遺伝子の分離

74.5 kDa抗原の部分的アミノ酸配列に基づき、下記の構造のCOD538と559のオリ

特開平2-291271 (11)

ゴヌクレオチド酸を含成した。なお、各アミノ酸の記号は、A l a (アラニン)、L y s (リジン)、G l u (グルタミン酸)、I s e (イソロイシン)、L e u (ロイシン)、G l y (グリシン)、A s p (アスパラギン酸)、S e r (セリン)、V a l (バリン)、A s n (アスパラギン)、G l n (グルタミン)、P r o (プロリン)である。塩基は、A (アデニン)、G (グアニン)、T (チミン)、C (シトシン)を示し、他の実施例においても同様とする。

COD 558

```

1
Ala--Lys--Glu--Ile--Ile--Leu--Gly--Ile--Asp--Leu--
AAA GAA ATA ATA TTC GG
  G  G  G  G  CA
    T  T  T
      C

```

COD 559

```

15
Ser--Val--Val--Leu--Ile--Asp--Glu--Asn--Gln--Lys--Pro
GTC CTG ATA GAC GAA AA
  A  T  G  T  G
    T  T
      C

```

サザン・ブロット分析により、COD 558とCOD 559は共に、異種交配により、10種の組換え体のうちの6種に存在する、長さ7.8 kbのEcoRI制限酵素断片になるものと認められた。この断片を二次増殖させるために、長さ7.8 kb断片(他の増殖する断片に加えて)を含む組換え体をラムダ5-5-59と称し、そのDNAを調製して、酵素EcoRIによって育成させ、EcoRIで育成されたベクターpWHA148に接合させて、大腸菌(E. coli)の菌株JM83に形質転換させた。形質転換体の1つをPMYCO16と命名した。そのDNAは、調製されたのち、種々の制限酵素(内部核酸分解酵素)によって育成させて、第5図中の制限マップを引出すようにしたものである。なお以下において、1,000個のヌクレオチド対を1キロベース(kb)とし、DNA断片の長さを表わす。

ベクターpWHA148は、合成オリゴヌクレ

オチドのこの10種の組換え体からDNAを調製し、大腸菌によって増殖し、ゲル電気泳動法によって分析された結果、各々が、若干個の制限酵素EcoRIの断片より成る肺炎病原体の染色体の各部分より成ることが認められた。この異種交配条件は下記のとおりである。

## 異種交配法

5 X N E T  
5 X ゲンハルツ  
2 X 10<sup>6</sup> c p m キナーゼ・ブローブ  
37℃

10時間

洗浄 5 X N E T

0.1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

常温において3 X

37℃において2 X

5 X N E T

1モルNaCl

90ミリモルTris pH 7.6

6ミリモルEDTA

オチドを、pUC18のHind IIIの部位に挿入することによって生成される。B-ガラクトシダーゼのX相補形ペプチドのアミノ酸末端番号付け配列は、第7図のとおりで、現のpUC18上に、追加の8個の制限部位を含む、pUC18へのオリゴヌクレオチドは、第7図のように、Sph IとHind IIIの部位の間に挿入される。この第7図は、プラスミドpWHA148内に生成されたB-ガラクトシダーゼ融合タンパク質のpUC18の配列と、付加された終点と、予想されるアミノ酸配列を示す。下段の文字は、pUC18のヌクレオチド配列の部分で、上段の文字は、pWHA148の合成オリゴヌクレオチド付加のヌクレオチド配列を示す。数字は、予想されるアミノ酸配列の順序を示す。

COD 558と559は、サザン法分析によれば、PMYCO16の長さ0.6 kb(キロベース)Acc I-Ase I制限断片に異種交配された。0.6 kb断片のDNA配列分析によれば、1) COD 558とCOD 559との類似性の範

## 特開平2-291271 (12)

間を包含し、2)断片のDNA配列によって予測されたアミノ酸の3種を除いてその他は、下記のとおり、分子量74.5 kDaに対して判別されるタンパク質配列に適合している。前記以外のアミノ酸の記号は、Met (メチオニン) と Thr (トレオニン) である。

タンパク質 1  
配列 ) ---Ala Gln Glu Ile Ile Leu Gly Ile Asp  
クローン ) met ala lys glu ile ile leu gly ile asp  
配列  
タンパク質 11  
配列 ) Leu Gly Thr Val Asn Ser Val Val Leu Ile  
クローン ) leu gly thr thr asn ser val val ala ile  
配列  
タンパク質 21  
配列 ) Asp Glu Asn Gln Lys Pro Val Val Leu  
クローン ) ile glu asn gln lys pro val val leu  
配列

実際のアミノ酸配列をさらに再分割した結果、3個の不適合は、アミノ酸の特定が不明確だったためと考えられる。

た。得られた溶解物の一部をポリアクリルアミドゲルで電気泳動させると、新たに43 kDaのタンパク質が特定された。

このpMYC016の43 kDa発現生成物は、ウェスタン・ブロット分析によれば、74.5 kDa肺炎病原体抗原に対して培養されたマウス血清に対して反応することが認められた。

このpMYC016の43 kDaの発現生成物は、ウェスタン・ブロット分析によれば、74.5 kDa肺炎病原体抗体に対向して生成される家畜免疫血清に対して反応することが認められた。

#### 大腸菌によって生成される74.5 kDa抗原断片の部分精製

大腸菌株CY15000形質転換体の1つを選び、1リットルの培養汁中で37℃で外産OD<sub>600</sub> = 2となるまで生長させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9緩衝液中で再懸濁させることにより、細胞を汚染培養成分のないように洗浄し、再び遠心分離によって採取する。得ら

第5図中、pMYC016の制限マップ中では、遺伝子は、長さ0.6 kbのAclI-AseI制限断片内で開始し、0.4 kbのAseI-ClaI、1.2 kb ClaI-ClaI、および1.4 kb ClaI-HindIIIの各断片内を時計方向に延長して、HindIIIの部位の近所で終了する。

#### 大腸菌内における肺炎病原体74.5 kDa抗原遺伝子の発現

pMYC016からのDNAは、大腸菌株CY15000に形質転換された。転換体の1つを選択し、OD<sub>600</sub> = 2〜3.7℃で牛肉汁中で生長させ、細胞は遠心分離法によって採取された。細胞をM9緩衝液中で再懸濁させ、汚染培養成分のないように洗浄させ、再び遠心分離して採取した。得られた細胞ペレットを、0.5 mg/mLの細胞リゾチームの25 mM Tris pH 8.0の10 mM EDTAへの溶液中で、原始培養体積の15分の1で再懸濁させた。25℃で10分間培養し、4℃で15秒間超音波処理させ

た細胞ペレットを、0.5 mg/mLの細胞リゾチーム (細菌溶解酵素) を25 mM Tris pH 8.0の10 mM EDTAに溶解した溶液の20 mL中に再懸濁させ、25℃で10分間培養し、2部分に分割し、各々を0℃で80秒間凍とうさせた。得られた液体を、4℃で10分間13,000 × gで遠心分離して、不溶の固形物を分離した。十分な量 (4.52 g) の硫酸アンモニウムを加えて40%上澄液を50%飽和まで到らしめ、遠心分離によって不溶のタンパク質を採取し、ポリアクリルアミドゲルを加えて電気泳動させた。ウェスタン・ブロット分析 (前記の小形家畜血清を使用する) によれば、43 kDaのpMYC016の発現生成物を含むことが認められた。濃縮した抗原分画を、ワクチンとしての使用前に、PBSに対して透析した。

#### (実施例2) 41 kDa肺炎病原体抗原

バクテリオファージ・ラムダダッシュのEcoRI (制限酵素) の酶が、ベクタークローン化装置 (ストレイタジ社製) によって得られ、これ

## 特開平2-291271 (13)

を、濃度100単位/mlにあるT4リガーゼ (BMB) を使用して、全容積10μl中に25μg/mlの濃度にあるマイコプラズマの目標のDNAに対して、200μg/mlの濃度で連結された。この連結反応は、室温で2時間熟成された。連結体の4μlを、ストレイタジン社製の試験管内封入形キット「ギガバック」を使用して、ラムダ粒子内へ封入した。次にこのファージを、大腸菌の菌株P2392 (ストレイタジン社製) 上に滴定し、 $7.75 \times 10^6$  pfu/mlの量 (ラムダダッシュの $3.1 \times 10^8$  pfu/μlに相当する) が定量された。

## 塩基オリゴヌクレオチドプローブの構築

41kDa肺炎球菌体の塩基の部分的アミノ酸配列を暗号付けするもような、Yベ基の可能なDNA配列が確認された。17塩基対 (bp) から成る2個所の配列も特定された。2種の混成配列オリゴヌクレオチドプローブが、COD447とCOD455として合成された。下表は、分子量41キログルトルの抗原遺伝子のスクリーニング

ライブラリーを示す。

-Cys-Tyr-Val-Lys-Pro-Gly-Gln-Ile-Met-Ala-Lys-Cys-  
Cod 455 Cod 147  
G G G  
T T T A T A T T  
TGC TAC GTA AAG CGA GG CAG ATC GCA AAA TG  
C C A C G

アミノ酸および塩基の記号は前記のものと同様である。

前記実施例1のライブラリーを、5枚のベトリ板上にあって、135mmベトリ板当たり2000pfuの濃度の大腸菌株LE392の上に設置した。各ベトリ板から2個のニトロセルロースフィルタを掲上げ、W. D. ベントンおよびR. W. デービス (サイエンス誌、1977年196-180に記載) の方法によって処理した。

フィルタを乾燥したのち、0.8M NaCl、90mM Tris-HCl、pH7.5の5mM EDTAより成る溶液中で再び浸潤させた。これらのフィルタを袋に納め、2.5mlの予備異種交配用溶液フィルタを追加した。

この予備交配用/異種交配用溶液の組成は、  
(mMはミリモル)

6XNET

5Xデンハルツ

0.1mM rATP (アデノシン三リン酸)

1.0mM NaPPi

10.0mMでpH7.5の塩酸ナトリウム

0.2% SDS

0.1mg/mlの超音波処理した鮭肝臓のDNA

250μg/mlの大腸菌の転移RNA

異種交配の予備操作は、37℃で2時間行った。次に予備交配用溶液を、袋から流下させ、各袋毎に3mlの第2の予備交配用溶液を追加した。第2の溶液は、第1の溶液と同一成分の他に、100mg/mlのラムダgt11 DNAの1mlと、362μg/mlの大腸菌DNAの5mlとを、50ml当りに追加したものである。両方のDNAを、大きき900bp以下になるまで超音波処理し、10分間煮沸し、使用直前

に急冷した。フィルタを、この溶液中で37℃で2時間予備処理を行った。

プローブを下記によって活性化した。即ち、18.5μl (マイクロリットル) の<sup>32</sup>P-ATP (7000Ci/mMole) を使用した2.4μlのCOD447 (2.00D/ml) か、あるいは49.0μlのp-ATP (7000Ci/mMole) を使用した6.5μlのCOD455 (2.00D/ml) を含む) を、20単位のT<sub>4</sub>付活添 (ベーリンガー社製) を含むする80μlの反応混成液中に混入させた。

付活性化した各プローブに、10mlの予備交配用溶液を追加した。袋から予備交配溶液を流下除去し、プローブを含む交配用溶液を、各フィルタ当りに約2ml添加した。これらを1晩 (約16時間) 37℃で培養させた。

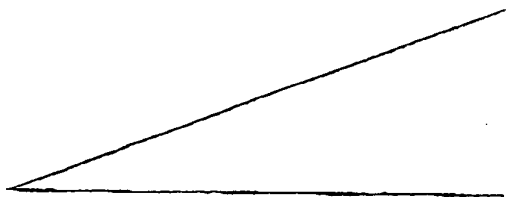
各フィルタを1リットル6X SSC中で10分間ずつ室温で4回洗浄したのち、100mlの3M塩化4メチルアンモニウムと、50mMトリスHClでpH8.0とし、2mMのEDTA

## 特開平2-291271(14)

と、1 mg/mlのSDS (TMAC) (DNA誌、B2、1585~1588頁による)とを添加した緩液中で室温で10分間ずつ4回洗浄した。次に各フィルタを、400 ml TMAC中で、50℃で10分間洗浄した。フィルタをサラップで包み(最初はフィルタを乾燥させないため)、-80℃で2重塩化メタクリンによって100コダックXAR5に露出させた。COD455とCOD447の両者に対して異種交配を示す適切な溶菌液を抽出し、DNAを調製した。このDNAを酵素EcoRIで培養し、2個の1%琼脂糖ゲル上で電気泳動処理を行った。このゲルをサザン式プロット法で検出した。このサザン・プロットは、COD447またはCOD455に対して異種交配された。これによって、2種のフージが、COD447とCOD455の両者に対して交配した2.5 kb p(キロ塩基対)の酵素EcoRIの断片を含むことが確認された。これらのフージを、ラムダマイコ1とラムダマイコ2と命名した。

4Ⅲを2次分選増殖させるために、pMYCO1からのDNAをXhoIとHindⅢで培養し、長さ0.2 kbの断片を精製し、XhoIとHindⅢで培養されたベクターpWH148に運送させて、大腸菌株JM83に形質転換させた。転換体の1種をpMYCO4(第2図)と命名し、そのDNAを調製して、XhoIとHindⅢで培養し、第2図の制限マップが得られた。

長さ0.2 kbの断片のDNA配列を分析して、それが1) COD455とCOD447と相同性のある部分を含むこと、および2) このDNA配列から予測されるアミノ酸は、その3種を除いた他のすべてが、41 kDa抗原に対して認められるタンパク質配列に一致することが判明した。これを下記に示す。



ラムダマイコ1とラムダマイコ2の大形DNAの調製は、山本、K. R. 他による文献(1970年ウイルス学全集40の734頁)によって行った。ラムダマイコ1からのDNAを酵素EcoRIで培養し、EcoRIで培養したベクターpUC9に運送させ、大腸菌株JM83に転換させた。形質転換体の1種をpMYCO1(第1図)と命名し、そのDNAを調製して、種々の制限酵素によって培養させて、第1図の制限マップが得られた。ラムダマイコ1とpMYCO1との制限マップを比較することにより、pMYCO1中のマイコプラズマの付加された、長さ1.0 kbのEcoRI酵素の断片は、実際は、ゲノム内の長さ2.5 kbのEcoRI酵素の断片の近傍にはないことが判明した。

COD455とCOD447は、サザン式プロット分析により、pMYCO1の長さ0.2 kbの酵素XhoI-HindⅢの制限断片へ異種運送されたことが判明した。DNA配列分析に対して、長さ0.2 kbの酵素XhoI-HindⅢ

タンパク質 1  
Met Asp Lys Phe Cys Tyr Val Lys Pro Gly  
配列  
クローン  
met asp lys phe arg tyr val lys pro gly  
配列  
タンパク質 11  
Gln Ile Met Ala Lys Cys Glu--Ile/Met Ile  
配列  
クローン  
gln ile met ala lys asp glu glu met ile  
配列  
タンパク質 21  
--- Phe Leu --- Ile ---Ile Asn Leu Leu  
配列  
クローン  
arg phe leu asp ile asp gly asn leu leu  
配列

実際のアミノ酸配列を改めて分析して分かったことは、3個所に不適合があり、これはアミノ酸の特定が不明確なためと推定された。

ラムダマイコ-1の制限マップ(図示せず)の一部を分析した結果、長さ0.2 kbのXhoI-HindⅢの断片が、マイコプラズマDNAラムダベクターの接合点の1つから約1.5 kbの位置にあることが分った。すべての遺伝子分

特開平2-291271(15)

増殖するために、ラムダマイコー-1 DNAをXhoIとKpnIによって消化し、XhoIとKpnIで増殖されたベクターpWHA148に接合して、大腸菌株JM83に形質転換させた。その1株をpMYCO15(第3図)と命名し、そのDNAを調製して、若干の異なる制限酵素で増殖し、第3図の制限マップが得られた。

転換体pMYCO15のマイコプラズマDNAの部分のDNA配列を分析した結果、全長41kDaの抗原遺伝子が含まれることが分った。pMYCO15の制限マップ上で、遺伝子は、長さ0.2kbのXhoI-HindIIIの断片内に始まって、時計方向に0.5kbのHindIII-EcoRIと1.2kbのEcoRIの各断片内をまわり、EcoRI部位の0.8kb手前で終わっている。遺伝子のDNA配列から求められたアミノ酸配列は、第14図のとおりである。

#### 大腸菌内における肺炎病原体41kDa抗原遺伝子の発現

分子量41kDa抗原のDNA配列は、暗号付

は、長さ0.5kbのHindIII-EcoRI断片内に存在する。

pMYCO8からのDNAは、大腸菌株CY15000に形質転換された。転換体の1株を選択し、L-肉汁中で37℃でOD<sub>550</sub> = 2となるまで成長させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9遠菌液中で再懸濁させることにより、汚染物質のないように細胞を洗浄し、再び遠心分離して採取した。0.5mg/mlの鶏卵白リゾチームを、25mM Tris pH8.0とした10mMのEDTA液中に溶解した溶液中に、採取された転換体のセルベレットを、最初の培養体積の15分の1で再懸濁させ、4℃で15秒間超音波処理する。得られた懸液を、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動で処理し、新たに14kDaのタンパク質が確認された。このタンパク質は、第1のTGAコドンまでの遺伝子で暗号付けされたペプチドから成る41kDaの抗原の断片についての予測された分子量を有するものである。

配列内に14個のTGAコドンが存在することを示した。TGAコドンは、マイコプラズマ中のアミノ酸トリプトファンを特定するが、通常、大腸菌内のタンパク質鎖の伸長を終了させ、従って大腸菌内における41kDa抗原の発現の結果、遺伝子で暗号付けされたペプチドから、第1のTGAで暗号付与されたトリプトファンまでを発現することが判明している。この41kDa抗原の断片の発現を増大させるために、pMYCO1(第1図)を、酵素HindIIIで増殖し、長さ1.3kbのHindIIIの断片を精製して、HindIIIで増殖させたpMYCO4(第2図)に接合させ、大腸菌株JM83に転換させた。転換体の1株をpMYCO8(第4図)と命名し、そのDNAを調製して、若干の酵素で増殖し、第4図の制限マップが得られた。

長さ0.2kbのXhoI-HindIII断片内にある、41kDa開始メチオニンは、ベクターpWHA148内にあるラクトースプロモータから約0.2kbの距離にある。TGA終止コドン

DBA/2のマウスを、肺炎病原体から分離された、20マイクログラムの電気泳動で精製した41kDaの抗原を完全フロイント免疫助成剤に入れたもので、免疫性を付与した。

最初の注射の2週間後には、完全フロイント免疫助成剤中で、補助注射を行った。肺炎病原体の全タンパク質のウェスタン法プロット分析により、免疫血清が、100分の1希釈において、特異的に41kDa抗原と反応することが判明した。この転換体pMYCO8の14kDa発現生成物は、ウェスタン法プロット分析により、41kDa肺炎マイコプラズマ抗原に対して作成されたマウス免疫血清と反応することが判明した。

(実施例3)

以下、肺炎病原体の全長が分子量で74.5kDaの抗原の大腸菌内における発現について説明する。

第5図のpMYCO16 DNAは、酵素AclIで増殖され、豆科の植物の低酸分解酵素で処理して、単一鎖構造のAclI末端を除去し、リ

特開平2-291271 (16)

ガーゼ処理して、74.5 kDa 抗原遺伝子の前面にある長さ1.9 kbのA<sub>cc</sub>I断片を除去して、大腸菌株JMB3の内部に形質転換させたものである。この転換体の1株をpMYC029と命名し、そのDNAを、多数の制限酵素で培養して、第8図の制限マップが得られた。

このpMYC029のDNA配列を分析した結果によれば、自然的欠失が、リガナー接合部位に存在し、2個の塩基が欠失されており、Pst I部位は保持され、下記のとおりである。但し、5'から3'までの鎖状構造のみを圖示した。

#### pMYC029

予想された TTGCATGGCTGCGAGGTACTTTCTTTTGTCT  
配列 Pst I

複製された TTGCATGGCTGCGAGGTACTTTCTTTTGTCT  
配列 Pst I

#### プラスミドpMYC031の構成と、分子重 74.5 kDa 抗原断片

pMYC029のマイコプラズマ挿入は、pW

挿入した。これは、第10図に示すとおり、トリプトファンT176遺伝子の許適な根源として利用できる。pCAM101からのDNAを、酵素EcoRIで培養し、トリプトファンT176遺伝子を含む長さ0.3 kbのEcoRI断片を精製し、EcoRIで培養したpMYC031に結合させて、大腸菌株CY15000中へ形質転換させた。この転換体の1株をプラスミドpMYC032と命名し、その制限マップを第11図に示す。

#### 肺炎病原体マイコプラズマ74.5 kDa 抗原の 大腸菌中における発現

CY15000 (pMYC032) 形質転換体の1株を選択し、レー肉汁で成長させ、前記同様に液体試料を調製して、その一部をペリアクリルアミドゲル中で電気泳動処理を行った。ゲル電気泳動分別により、新たに分子重75 kDaと43 kDaのタンパク質が特定されそれぞれが大腸菌タンパク質の約5%および0.1%であった。pMYC032の75 kDaタンパク質は、ウェス

HA148のラクトース(Lac)プロモーターから遠い位置にあるので、遺伝子を他の発現ベクターであるpUC9に挿入することが必要と考えられた。2個の塩基の欠失によって、分子重74.5 kDaの抗原に対する遺伝子は、大腸菌のベクターpUC9のベータガラクトシダーゼ遺伝子と同様な採取り様に置かせることが可能となった。

この構造を完成するために、pMYC029のDNAを、Pst IとEcoRIで培養し、74.5 kDaの全体の順序配列を含むPst I-EcoRI断片を精製し、Pst IとEcoRIで培養されたベクターpUC9に結合させて、大腸菌株JMB3へ形質転換させた。この転換体の1株をpMYC031と命名し、そのDNAを調製したのち、実施例1の転換手法により、大腸菌株CY15000中へ形質転換させた。

#### プラスミドpMYC032の構成

プラスミドpCAM101を、コロラド州ボルダのコロラド大学のジェームス・カラン氏から

タン法プロット分析により、前述の74.5 kDa 肺炎病原体抗原に対して作成された血清の免疫血清に対して反応することが認められた。

(実施例4)

以下、肺炎マイコプラズマの分子重74.5 kDaの抗原のワクチンとしての使用について説明する。

CY15000 (pMYC032) 形質転換体の1株を実施例3から選択し、14リットルのシェマッブ培養器内のM-9緩衝液の最少量中で、細胞密度が1100.0となるので成長させた。遠心分離により、500 mlから、600 gおよび120 g (濃稠重量)の細胞を採取した。12 mMのEDTAと0.5 mg/mlのリゾチームを含むPBSの10 ml当りに、2.3 gの細胞より成る懸濁液を作成した。懸濁液を25℃で15分間熱処理させ、30秒バーストして2分間氷上で超音波処理し、4℃において10分間13,000 gの加速度で遠心分離させ、俗稱分離物を生成分として得た。生成物の一部をポリア



特開平2-291271 (17)

クリルアミドゲル中で電気泳動処理した。可溶性タンパク質の約25%から作成された遺伝子組換え形の74.5kDa抗原と、生成物中の74.5kDa抗原の量に基づく投与量を、PBS中で1投与量当り200μgと1000μgを作成し、家豚に投与する直前に、フロイント社の不完全補助剤(シグマ社製)の混合物で氷上で乳化させた。

## ワクチン試験

- 第0週 ハンブシャーイブ種、ハンブシャーイブ×デュロックの混種およびヨーク種の3種の仔豚(無菌飼育区より入手)
- 第1週 ランダムに7群の疫菌株に分割し、各群毎に足の皮下にワクチン接種
- 第3週 上記同様で、反対側の脚に補助ワクチン接種
- 第8週 10<sup>6</sup> cfuの肺炎マイコプラズマ病原体の経気管注射により抗原投与
- 第12週 供試仔豚の解剖検査の感染制御
- 結果は下記のとおりであった。

ミノ酸配列とを比較して次の表が得られた。

タンパク質 1	
配列	Met Ala Asn Ile/Ser Ile/Asp Ala/Lys Ile
クローン	
配列	met ala asn ser asp lys ile
タンパク質 2	
配列	Ala Leu Asn Gly/Asn Ala/Ile Met/Gly Ala
クローン	
配列	ala leu asn asn ile gly ala

すべての遺伝子を分離増殖するために、第3図のpMYCO15をFspIとHindIIIで培養し、HindIIIとSmaIで培養されたベクターのpUC9(TGAサンプレッサを欠くベクター)とpWHA160(TGAサンプレッサを有するベクター)に接合して、大腸菌株JM83中へ形質転換させた。pUC9の転換体の1種をpMYCO39と命名し、pWHA160の転換体の1種をpMYCO40と命名した。それらのDNAを調製し、若干種の制限酵素で培養して、第12図と第13図の制限マップを作成した。

グループ	発生 *	軽重度 **
制 制	5/5	12.4 ± 4.7
100μg 74.5kDa 抗原	1/4	1.2 ± 4.9
200μg 組換え形	2/6	9.7 ± 11.7
74.5kDa 抗原		
1000μg 組換え形	4/4	25.0 ± 6.1
74.5kDa 抗原		

\* 5%以上の肺部感染のある仔豚の数

\*\* 肺臓を受けた豚の表面(平均±標準偏差)

(実施例5)

肺炎マイコプラズマ病原体の分子量36kDaの抗体の大腸菌内における発現について説明する。

ラムダマイコー1(実施例2)から得られた副コロニーのDNA配列の分析の結果、長さ1.2kbのEcoRI-EcoRIの断片は、36kDa抗原の暗黒配列の促進部分に相当する開いた読取り枠を含んでいる。肺炎病原体から精製された真正の36kDa抗原に対して得られたアミノ酸配列と、この開いた読取り枠から推論されるア

ペクターpWHA160は、ペクターpUC9のEcoRI部位に挿入されたプラスミドpCAM101からのトリプトファンT176遺伝子を含む256対の塩基対のEcoRI断片より成るもので、ラクトースプロモーターから誘導される密のものであった。

プラスミドpMYCO39とpMYCO40からのDNAは、大腸菌のCY15000株に形質転換された。各転換体を選択し、L-肉汁中で37℃でOD<sub>550</sub> = 2になるまで増殖させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9緩衝液中で再懸濁させて、細胞群を媒質からの汚染のないように洗浄し、再び遠心分離によって採取した。得られた細胞ペレットを、0.5mg/mlの過期白のリゾチームを、25mM Tris pH8.0の10mM EDTAに溶解した溶液中で、最初の培養容積の15分の1で再懸濁させ、25℃で10分間熱成させ、4℃で15秒間超音波処理した。採取培養液の液相と、可溶分と細胞部分を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で処理

## 特開平2-291271 (18)

し、プラスミド pMYC039 と pMYC040 の細胞部と被膜部の各々中に、それぞれ新たに分子量 29 kDa と 36 kDa のタンパク質が確認された。この 29 kDa と 36 kDa の組換え形タンパク質が、全体の抗原を含むものと推定される。

免疫血清

豚飼育で、初乳を与えない家豚を、実験的に肺炎病原体に感染させ、回復期の期間に血清を採取した。肺炎病原体タンパク質のウェスタン法ブロット分析によれば、分子量 36 kDa の抗原を含む多種のマイコプラズマタンパク質の 50 分の 1 の濃度に対して、免疫血清が反応することが判明した。プラスミド pMYC039 の 29 kDa タンパク質および pMYC040 の 36 kDa タンパク質は、ウェスタン法ブロット分析により、回復期の家豚血清に対して反応することが判明した。

DBA/2 のマウスを、完全免疫助成剤中で、電気泳動法で精製した分子量 36 kDa 抗体（肺

炎病原体から分離した）の 10 マイクログラムによって免疫性を付与した。第 1 回接種 2 週間後に、不完全フロイント助成剤中で、補助接種を行い、マウスを 1 週間後に採血した。肺炎病原体タンパク質の全部をウェスタン法ブロット分析して、免疫血清が、100 分の 1 希釈において、特異的に 36 kDa 抗原と反応することが認められた。プラスミド pMYC039 の 29 kDa タンパク質および pMYC040 の 36 kDa タンパク質は、ウェスタン法分析により、病原体抗原に対して作成されたマウスの免疫血清に対して反応することが認められた。

また、DBA/2 のマウスを、完全免疫助成剤中の、電気泳動法で精製した 36 kDa タンパク質（pMYC040 を含む大腸菌より分離したもの）の 10 マイクログラムによって免疫処理した。第 1 回接種 2 週間後に、不完全フロイント助成剤中で、補助接種を行い、1 週間後にマウスから採血した。肺炎病原体タンパク質全体をウェスタン法ブロット分析して、この血清が 100 分の

1 の希釈において、特異的に 36 kDa 抗原と反応することが認められた。

これらの結果の示すことは、プラスミド pMYC040 から生成された 36 kDa タンパク質は、肺炎病原体 36 kDa 抗原の遺伝子組換え形複製体であるということである。

組換え形の 36 kDa 抗原から、被膜タンパク質の約 10% が生成され、試料中の 36 kDa 抗体の量に基づいて、各投与量が、1 ml 当たり 50 マイクログラムの濃度で PBS（リン酸緩衝食塩水）中に作成され、家豚に投与する直前に、等容積のフロイント不完全助成剤（シグマ社製）を加えて水上で乳化させた。

プラスミド pMYC050 の開発

プラスミド pMYC040 のラクトースプロモータは、分子量 36 kDa 抗原遺伝子の出発点から 1000 対以上の塩基対である。1 つの遺伝子とそのプロモータとの間の距離を増加すると、多くの場合、組換え形タンパク質の発現を促進させることが多い。組換え形 36 kDa 抗原の発現

レベルを高める意図に基づき、pMYC040 から調製された DNA は、酵素 Hind II で培養し、さらに T4 リガーゼを作用させて、大腸菌の JM83 株に形質転換させた。転換体のその 1 株を、第 15 図のプラスミド pMYC050 と命名し、その DNA を調製し、制限酵素によって培養して、第 15 図の制限マップを作成した。pMYC050 のラクトースプロモータは、約 800 塩基対の位置に、pMYC040 中におけるよりも、36 kDa 抗原遺伝子の出発点に近い所にある。

プラスミド pMYC050 からの DNA を大腸菌の CY15000 株に転換させた。数種の転換体を選択し、L-肉汁中で 37℃ で OD<sub>600</sub> = 2 なるまで増殖させ、全菌液およびライソソル可分画液を前記同様に調製した。なお、この分子量 36 kDa のタンパク質の発現は、pMYC050 内の TGA サブプレッサによって左右される。これは、pMYC039 には、Hind II によって生じる同じく 800 塩基対の欠失があるためにそ

特開平2-291271 (19)

れを発現できないからである。

前記飼育された豚豚に、pMYC050から得た組換え形36kDaタンパク質の約100マイクログラムを、アンフィゲン（商品名）で助成したのによって免疫性を付与させた。第1回接種2週間後に補助接種を施して、1週間後にこの豚から採血した。肺炎病原体の含量をウェスタン法ブロット分析して、この免疫血清が、36kDa抗原を特定的に認識することが認められた。これらの結果は、プラスミドpMYC050によって生成される36kDaタンパク質は、肺炎病原体36kDa抗原の組換え形複製体であることを指示するものである。

#### (実施例6) 組換え形36kDa抗原のワクチンとしての使用

プラスミドpMYC050のトライトン可溶分を前記同様に調製した。この可溶分は、組換え形の分子重36kDaの抗原が、全体の約80%を構成するとするタンパク質を、1ml当たり1.8マイクログラム含有したものである。0.35

6頭の供試豚制御グループに、7.3%の豚肺炎菌の回復、3頭の試験グループには、3.8%の豚肺炎菌の回復が認められた。

#### (実施例7) 肺炎病原体の74.5kDa抗原のE116変種の、大腸菌内における発現形質転換体M13MYC0102の構成

プラスミドpMYC031を分子重74.5kDaの抗原遺伝子（実施例3と第9図参照）の酵素として使用した。M13mp18RF DNA（ベセスダ研究所製）は、7253塩基対ファージベクター（第16図）であって、これを酵素HindⅢ（マンハイムのペーリンガー社製）とPstⅠ（ベセスダ研究所製）で培養し、T4リガーゼ（ペーリンガー社製）を使用してHindⅢとPstⅠで培養したプラスミドpMYC031に作用させて、大腸菌JM103菌株に転換させた。その転換体の1種を変種M13MYC0102とし、これを種々の制限酵素で培養することによって、第17図の制限マップが求められた。

mlのトライトン可溶分と、4.15mlのPBSと5.0mlのフロイント不完全助成剤とが、各5μl毎分に相当する乳化ワクチンを調製した。

ネブラスカ大学において、無菌飼育室から提供され、初乳なしで飼育された仔猪を、隔離室に収容して、ワクチン供与/抗原抗体試験を遂行した。家豚のマイコプラズマ性肺炎（MPS）に対する予防用の、組換え形36kDa抗原を評価するための試験法規定は下記の通りである。

#### ワクチン接種と抗原抗体試験規定

供試豚作例

要領

- |      |   |
|------|---|
| 3週齢  | 第1回接種、100マイクログラムの組換え形36kDa抗原を、不完全フロイント助成剤混入で使用する。 |
| 6週齢  | 上記と同量で第2回接種                                       |
| 9週齢  | 10% C C Hの肺炎病原体株P-5772-1により抗原供与、気管内供与             |
| 10週齢 | 剖検、肺炎病巣の検出  |

#### M13MYC0107の構成

分子重74.5kDa抗原遺伝子のDNA配列を基幹として、96塩基長さの合成オリゴヌクレオチド、即ち下記のCODB39を転換して、2個のアミノ酸を生成させるようにした。

#### COD B39

11

LEU-GLY-THR-THR-ASN-SER-VAL-VAL-ALA-ILE-ILE-GLU

CTT-GCA-ACA-ACA-AAC-TCA-GTT-GTT-GCA-ATT-ATT-GAA  
-TGT-TGT-TTG-AGT-ACA-CAA-CGT-TAA-TAA-CTT

22

ASN-GLN-LYS-PRO-VAL-VAL-LEU-GLU-ASN-PRO-ASN-GLY

AAT-CAA-AAA-CCT-GTC-GTT-GTC-GAA-AAT-CCC-AAC-GGA  
TTA-GTT-TTT-GGA-CCG-CAA-GAG-CTT-TT

即ち、「核酸研究報告」13の8749～8764頁および、同じく13の8764～8785に掲載のチャーラー他による2種の方法に基づく突然変異法により、抗体のN-末端にある2個のアミノ酸に変化させるものである。このCODB39に伴う突然変異によって、Val<sup>11</sup>（バリ

特開平2-291271 (20)

ン<sup>17</sup>)をCys<sup>17</sup>(シスチン)に変化させて、DdeI部位を破壊させ、Val<sup>17</sup>をArg<sup>27</sup>(アルギニン)に変化させて、ThaI部位を新たに生成させる。これらの変化は、前記の大腸菌Jm83のタンパク質内にある予想された両性らせん性の2つの領域を再生させるものである。

「核酸研究報告」14の9679～9688頁(1986)のK. 中岡とF. エクスタインの方法によって作成した、M13MYCO102の単一鎖DNAを、M13MYCO107と命名される組換え体候補物を生成するのに使用された。第18図のオスチップ中での結晶として使用した。このDNAは調製後に、突然変異による変化の1つを検証するために、酵素ThaIで培養した。予想通りに、第19図のM13MYCO107は、長さ2kbの断片を0.4と1.6kbの2個の断片に変換させるThaI部位を追加して有するものである。M13MYCO107のDNA配列を分析し、M13MYCO102のそれと

比較することによって、これらの変化はいずれも確認され、COD639のいずれの側においても70塩基対内には、何ら変化が起こらないことを示した。

#### プラスミドpMYCO116の構成

実施例3、第11図のプラスミドpMYCO32を精製し、これを酵素PfuI(ニューイングランドバイオラプス製)で培養し、作体の腸内酵素ファスファターゼ(CIP、ペーリンガー社製)で処理し、PstI(酵素、プロメガバイオテック製)とAbaII(ニューヨーク、バイオラプス製)で培養し、再びCIPでファスファターゼ処理して、大腸菌Jm83菌株に転換させた。その1種をプラスミドpMYCO116と命名し、そのDNAを精製しHindIIIで培養して、長さ2.2kbの挿入部位を検証した。精製した第20図のpMYCO116のDNAを、大腸菌のCY15000株の転換に使用した。精製したコロニーの1つを、100μg/mlのアンピシリンを含むL肉汁中で増殖させた。通常の遠心分

離で細胞を採取し、8%のシェット、0.5%のトライトンX-100、50mMのEDTA、10mMのTris pH8、3、および0.56mg/mlの鶏卵白リゾチーム(H&L、シグマ社製)より成る混液中で、再懸濁させ、100℃まで短時間加熱した。上澄み液からのプラスミドDNAを、HindIIIで培養し、正塩の挿入を検証した。ThaIとDdeIの培養が、新しいThaI部位の存在と、0.26と0.76kbの2つの断片を単一の1.0kb断片に変換させるDdeI部位の欠陥とを検証した。

#### プラスミドpMYCO116生成物の発現

CY15000の細胞(pMYCO116)を採取し、洗浄し、25mM Tris pH8、0の10mM EDTAと、0.5mg/mlの鶏卵白リゾチームとの混液中で15分間超音波処理した。上澄み液(可溶分)の2マイクロリットルを、12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動処理した。プラスミドpMYCO116が、可溶タンパク質の約10%を占める分子量74.5

kDaのタンパク質を生成し、これはプラスミドpMYCO32によって生成されるものと同様の大きさである。

125mLの培養液の可溶分を前記同様に調製し、分子量74.5kDaの生成物を電気泳動によって精製した。31のアミノ酸残分のアミノ酸配列を分析した結果により、操作されたタンパク質が確認され、バリンVal<sup>17</sup>がシスチンCys<sup>17</sup>に変換されることを裏付けるに足る。しかしながらシスチンは、信号が弱いためにタンパク質配列の分析では直接に検証することはできない。バリンVal<sup>27</sup>からアルギニンArg<sup>27</sup>への変換は、残部27においてバリンの代りにアルギニンを検出することによって確認された。

#### (実施例8) ワクチンの成分として使用する際の、プラスミドpMYCO32生成物のワクチン精製の処方と試料

CY15000の細胞(pMYCO116)を、14リットルのシェマップ増殖器中の、リン酸ナトリウム緩衝化少量媒剤中で、84外徑

## 特開平2-291271 (21)

600の細胞密度となるまで成長させた。湿潤重量360gの細胞が、4.2リットルから採取された。100gの細胞を、12mMのEDTAを含有する300mLのPBS中に懸濁させた。5〜8,000psi(ポンド/平方インチ)の供給圧で作動するメントシ・ボーリン型ホモジナイザで、細胞分裂を促進させた。1リットルの採取量に対して10セルまでのEDTAを添加することにより均質化を促進させた。均質化させた液質を微細濾過により透明化した。濾液の50mLを、100mLの逆流DEAEカラムに供給し、試料およびカラムを、50mMリン酸ナトリウムでpH7.0とし、2mMのEDTAを加えた緩で平衡させ、結合しない部分は生成物として保持された。この試料を無菌濾過させる。使用の直前に、100μg/mLのPBSを添加して乳化させてワクチンとして使用する。1回の投与量は、100μgの精製成分と等価である。

#### ワクチンとして使用する際のpMYC0116の組成

のPBSを添加して乳化させ、ワクチンとして使用する。1回の投与量は、100μgの精製成分と等価である。

6種のワクチンの処方を、6群の仔豚に投与するために規定した。下記ワクチンについて説明すると、「r74.5kDa」は、遺伝子組換え法によって形成した肺炎病原体の74.5kDa抗原で、「r116」は、74.5kDaタンパク質から遺伝的に操作した変種であり、その中では、2種のアミノ酸の変化、即ち前述の変化が74.5kDa抗原内で起されたものである。すべての組換え形74.5kDa抗原の処方には、少なくとも純度95%の抗原を使用した。「アンフィゲン」とは、MRKスマーケティングサービスInc(ネブラスカ州エルクホーン)で開発された油性水性の免疫助成剤である。「アルヒドロゲル」は、3%水酸化アルミニウムである。「クイルA」は、樹木のセラヤサボラリアの樹皮から抽出して得られた、半精製グリコシドである。このグリコシドは、複合タンパク質を結合さ

大腸菌株CY15000(pMYC0116)を、リン酸ナトリウム緩衝化した少量の媒剤中で、14リットルのシェマッブ培養器中で、84時間600の細胞密度となるまで成長させた。湿潤重量360gの細胞が4.2リットルから採取された。100gの細胞を、12mM EDTAと0.5mg/mLの卵卵白リゾチームを含む300mLのPBS中に懸濁させ、25℃で15分間熱成させ、氷上で2分間、30秒間バーストして超音波処理し、回転加速度13,000gで10分間4℃で遠心分離した。可溶分を保持した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によつて、分子量74.5kDaの抗原が、約10%の可溶成分、即ち培養液1リットルに約2.5gの生成物を含むことが知られた。可溶分50mLを100mLの逆流DEAEカラムに供給し、試料およびカラムを、50mMのリン酸ナトリウムでpH7.0とし、2mMのEDTAを加えた緩で平衡させ、結合しない部分は生成物として保持された。使用の直前に、100mg/mL

せる機能がある。ワクチンA、B、C、Dは、ノーザンラボラトリーズ社で測定され、100ppmのメルチオレートを含む。ワクチンEとFは、コドン社(南サンフランシスコ)で測定された。

ワクチンA、B、C、DとEは、1接種に2mLを臀部の皮下に注射し、1頭1回当たり、100μgの量の抗原に相当した。補助注射は、臀部の他側に行った。

ワクチンFは、各鼻孔内に1.0mLの量を投与し、1頭1注射につき100μgの抗原に相当した。ワクチンの処方下記のとおりである。

- A) PBS + アンフィゲン
- B) r74.5kDa + アルヒドロゲル (12重量%)
- C) r74.5kDa + リボゾーム/クイルA
- D) r74.5kDa + アンフィゲン (5% V/V)
- E) r116 + アンフィゲン (5% V/V)
- F) r74.5kDa + PBS

42頭の仔豚を7頭ずつの6群に分割した。A

## 特開平2-291271 (22)

からFまでの6群の各々は、ワクチンA、B、C、D、E、Fの何れか1種を接種した。仔豚を各群に生後14日において割当てた。この時点で全頭から3mLずつ採血し、秤量し、ワクチンA、B、C、D、E、Fの何れか1種の2mLで、各仔豚の割当てられた群に従って、ワクチンを作成した。

各仔豚は、生後28日齢において離乳させ、35日齢において2回ワクチン投与した。第2回投与前に、全仔豚から3mLずつ採血した。

42日齢に達した時、同以て消毒消毒した独立室に各仔豚を収容した。生後49日齢、全仔豚から採血し、秤量し、肺炎病原菌株P-6722-3の10<sup>8</sup> C C Uの2mLを気管内注射した。

生後63日と77日に再び採血、秤量し、1.4から2.3mg/kgのスリタールで不動状態とし、窒息死させて採血させた。肺を取出して、肺炎の回復度を検定した。予備抗原投与時と検定時における、各仔豚の体重増加データを集成し

た。肺部肺炎回復指数と体重増加データを、下記表1と2として各々集成した。

## 第1表

## 肺部の快復率(%)

## A群: PBS + アンフィゲン使用

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	16.2	24.7	40.9
2	3.0	42.8	45.8
3	26.4	6.5	32.9
4	2.0	38.9	40.9
5	7.2	25.5	32.7
6	8.4	0.0	8.4
7	5.2	0.0	5.2
平均値	11.6 +/- 12.7	19.9 +/- 10.0	31.5 +/- 17.4

## B群: r 7 4, 6 k D a 抗原 + 助成剤 7A77044

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	7.3	9.9	17.2
2	3.7	30.5	34.2
3	10.2	0.0	10.2
4	25.3	0.0	25.3
5	14.6	0.0	14.6
6	0.0	0.0	0.0
7	0.0	3.4	3.4
平均値	8.7 +/- 9.1	6.3 +/- 11.3	15.0 +/- 12.0

## C群: r 7 4, 5 k D a 抗原 + 助成剤 7Y-4/744A

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	1.0	38.2	39.2
2	5.6	22.4	28.0
3	0.0	2.7	2.7
4	11.3	0.0	11.3
5	3.2	0.0	3.2
6	5.4	0.0	5.4
7	11.3	3.1	14.4
平均値	5.4 +/- 4.6	9.6 +/- 15.3	15.0 +/- 14.2

## D群: r 7 4, 5 k D a 抗原 + 助成剤 7N7717N

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	11.3	38.7	50.0
2	0.7	31.2	31.9
3	21.0	14.2	35.2
4	0.6	14.3	14.9
5	13.3	14.4	27.7
6	1.2	9.7	10.9
7	18.1	7.2	25.3
平均値	9.5 +/- 8.6	18.5 +/- 11.7	28.0 +/- 13.0

## E群: E 1 1 6 + アンフィゲン (助成剤)

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	0.2	33.2	33.4
2	30.0	0.0	30.0
3	6.0	19.9	25.9
4	3.2	26.4	29.6
5	4.9	2.1	7.0
6	7.2	0.2	7.4
7	1.0	0.0	1.0
平均値	7.6 +/- 10.2	10.1 +/- 14.0	20.7 +/- 12.7

## F群: r 14.5 k D a 抗原 + PBS (公認内投与)

家畜番号	固着病巣	斑点病巣	合計
1	4.0	18.0	22.0
2	3.0	0.0	3.0
3	0.0	0.0	0.0
4	2.7	0.0	2.7
5	6.1	0.0	6.1
6	8.4	0.0	8.4
7	3.5	0.0	3.5
平均値	3.8 +/- 2.2	2.6 +/- 6.8	6.4 +/- 7.2

## 特開平2-291271 (23)

第 2 表

体重増加率、ワクチン投与から剖検まで

A 群: PBS + 助成剤アンフィゲン

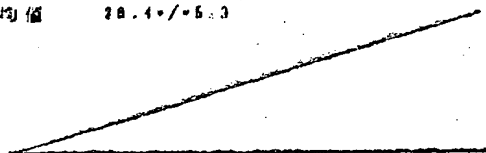
家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	38	64	26
2	39	72	33
3	21	43	20
4	28	56	27
5	34	63	31
6	33	60	27
7	33	64	31

平均値 27.6 +/- 4.3

B 群: r 74, 5 k D a 抗原 + アルビドロゲル

家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	39	69	30
2	40	74	34
3	24	54	30
4	22	48	26
5	28	57	29
6	29	48	19
7	17	71	54

平均値 28.4 +/- 5.3



C 群: r 74, 5 k D a + 助成剤リキソ-Δ/タイラ

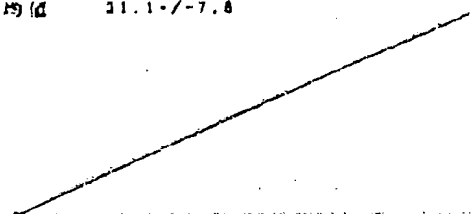
家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	32	60	28
2	33	58	25
3	18	42	24
4	21	48	27
5	20	56	36
6	27	57	30
7	30	52	22

平均値 26.3 +/- 2.8

D 群: r 74, 5 k D a 抗原 + 助成剤アンフィゲン

家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	40	79	39
2	41	70	29
3	16	32	17
4	24	53	29
5	38	68	29
6	33	60	26
7	33	72	39

平均値 31.1 +/- 7.8



E 群: r 116 抗原 + アンフィゲン

家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	35	66	31
2	22	46	24
3	21	48	18
4	26	60	34
5	37	69	32
6	32	64	32
7	36	69	33

平均値 28.3 +/- 5.6

F 群: r 74, 5 k D a 抗原 + PBS (鼻腔内投与)

家畜番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	32	61	29
2	26	53	28
3	19	45	26
4	15	31	16
5	33	66	33
6	30	59	29
7	33	64	31

平均値 27.4 +/- 5.7

(実施例 9) 74, 5 k D a 抗原のアミノ酸 211 に対応する TGA コドンの突然変異

第 6 図は、分子量 74, 5 k D a の抗原遺伝子の形質転換を示す。この 74, 5 k D a 遺伝子の 211 位置におけるアミノ酸トリプトファンは、

TGA の暗号が付与されている。プラスミド pMYCO31 と pMYCO32 によって生成されるタンパク質を検討して分ったことは、TGA コドンは、trpT176 サンプルレサがない場合は、大腸菌 (E. coli) 内のペプチド鎖の伸長を停止させることである。試験管内での突然変異によって、コドン TGA を TGG に置換させれば、trpT176 サンプルレサがなくても、211 位置におけるペプチド鎖の伸長を可能ならしめると想定した。

プラスミド pMYCO32 を、酵素 Hind III で培養し、74, 5 k D a 抗原遺伝子を含む長さ 2.2 k b の断片を、T4 リガーゼを使用して、Hind III で培養されたベクター pUC9 に作用させて、大腸菌の JM83 菌株に形質転換させた。その 1 種をプラスミド pMYCO56 と命名し、その制限マップは第 21 図のようになる。予定の通り、pMYCO56 は、74 k D a 抗原の早目に終止した断片を生成する。

第 18 図の M13mp18 RF DNA は、

## 特開平2-291271 (24)

7253の塩基対のファージベクターで、これをHindⅢとPstⅠで培養し、T4リガーゼを使用して、HindⅢとPstⅠで培養されたpMYCO31に作用させて大腸菌のJM103菌株に転換された。転換体の1種のM13MYCO102(第17図)からのDNAを、種々の制限酵素で培養させて、第17図の制限マップを得られた。

74.5kDa抗原遺伝子のDNA配列を基幹として、38塩基長の合成オリゴヌクレオチド、即ち下記のCOD639を、TGAを変化させるように設計した。その方法は、「核酸研究」13巻の8749～8764頁と8784～8786頁のテラー他の方策により、部位特異突然変異を利用する方法である。

204 TRP ASP ASN GLU ILE VAL ASN TRP LEU VAL  
 LYS LYS ILE LYS TGG GAT AAT GAA ATT GTA  
 AAT TGA GTT GTT AAA AAA ATC AAA GC CTA  
 TTA CTT TAA CAT TTG ACC GAA CAA TTT TTT  
 .T

pMYCO56のDNAを酵素SstⅠで培養し、子牛の腸内酵素のファスファターゼで処理し、T4リガーゼを使用して、SstⅠで培養されたM13MYCO79に作用させて、大腸菌のCY15000菌株に転換させた。その1種をプラスミドpMYCO67と命名し、その制限マップは、プラスミドpMYCO66と同一と判明した。74.5kDa抗原と同様に、プラスミドpMYCO87で、211位置におけるペプチド鎖の伸長は可能となり、約74kDaのタンパク質が生成される。

pMYCO87のアンピシリン耐性をテトラサイクリン耐性に変換させるために、pMYCO87のDNAを酵素AflⅢとEcoRIによって培養し、リガーゼT4を使用して、テトラサイクリン耐性クローニングベクターpBR322の2.5kbのAflⅢとEcoRIの断片に作用させて、大腸菌のMH1菌株に形質転換させた。

転換体の1種をプラスミドpMYCO91

「核酸研究」の第14巻、9679～9698頁(1986)記載のK、中前とP、エクスタインの方法によって調製したM13MYCO102の単鎖DNAを、第18図の各ステップにおける鎖型として使用した。但し、オリゴヌクレオチドのCOD639が、1箇所だけ突然変異をまじえている。

4個の制限酵素を選び、それらのDNAを取出し、DNA配列を分析した結果、いずれの制限酵素も所望のTGAからTGGへの変異が成されたことが判った。TGAコドンと同様に、このTGGコドンは、トリプトファンに対して暗号付けする。但しTGAと異なる点は、TGGは、大腸菌によって終止コドンとは認識されない点である。4個の制限酵素のすべてからのRfDNAをプールしてM13MYCO79と命名し、その制限マップは、M13MYCO102と同様であることがわかった。

通常の74.5kDa抗原遺伝子を、TGGコドンの複製体に置きかえるためには、プラスミド

(第22図)と命名し、そのDNAを種々の制限酵素で培養して、図示のマップを得た。予想どおり、このpMYCO91は、約74kDaのタンパク質を生成する。このpMYCO91の機能領域は、第23図中に表示されている。

なお、プラスミドpMYCO87とpMYCO91は、共に、TGAサンプレッサがない状態で、74.5kDaの抗原に対して暗号付けをする。

#### (実施例10) 肺炎病原体の41・kDa抗原分子重41・kDa抗原に対する遺伝子の特定

さきに実施例1に記載したラムダ5-5-59から引出された再分離増殖体のDNA配列の分析によれば、長さ6.8kbの断片は、仮想的なマイコプラズマタンパク質41・kDaに相当する開いた読み取り枠を有することが示された。この予知されたアミノ酸配列は、大腸菌のdnaJ菌株のものと58%まで同一であった。このdnaJと41・kDaとの各配列の一部分の比較は下記のとおりである。



## 特開平2-291271 (25)

dnaj (配列): Met Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu

41\* (配列): met ala lys gln asp phe tyr lys tyr lys

dnaj (配列): Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu

41\* (配列): gly val glu lys ser ala ser leu thr glu

dnaj (配列): Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met

41\* (配列): ile lys lys ala tyr arg asn leu val asn

dnaj (配列): Lys Tyr Ile Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp

41\* (配列): ile tyr his pro asp lys asn thr lys lys

この41\*内でのアミノ酸配列は、その50%以上がdnajのアミノ酸配列と同一であると共に、41\*抗原がdnajの同族体であることが、下記の事実から支持された。即ち(1)大腸菌dnajの遺伝子は、大腸菌dnakの遺伝子からの流れをくむものであること、(2)大腸菌の株dnakとdnajとの間には、AAUUUループを持った16対の塩基対基幹を形成する潜在力を有する逆位反復部が存在すること。この2

268と4457との間にある)を精製し、T4リガーゼを使用してBamHIとSmaIで培養されたベクターpUC9に作用させて、大腸菌株JM83に転換させた。その1種をプラスミドpMYC074と命名し、そのDNAを調製し、HindIIIで培養し、165番目の塩基対HindIII-HindIIIの断片を精製し、T4リガーゼを使用して、HindIIIで培養されたpMYC073に作用させて、大腸菌株JM83に転換させた。その1種をプラスミドpMYC080と命名し、その制限マップは第26図である。

このpMYC080からのDNAを大腸菌株CY15000に転換させた。いくつかの転換体を選択してL肉汁中37℃で、外径OD<sub>550</sub>=2となるまで成長させ、遠心分離により細胞を採取した。細胞を、媒質成分による汚染を除くためにM9緩衝液に再懸濁させて洗浄し、再び遠心法で分離採取した。得られた細胞ペレットを、0.5mg/mlの陽卵白リゾチームを25mM Tris pH8.0の10mM EDTAに溶解し

種の構造は、いずれも肺炎病原体内に保有されている。

#### プラスミドpMYC080の調製

第11図、第25図のプラスミドpMYC032を、分子量41kDa抗原遺伝子の源泉として、種々の発現プラスミドの開発に使用した。

74: 6kDaと41\*の抗原遺伝子は、プラスミドpMYC032中に含まれている。74: 5kDa抗原の遺伝子を除去するために、pMYC032を調製して酵母HindIIIで培養し、T4リガーゼを作用させて、大腸菌株JM83に形質転換させた。その内の1種をpMYC073と命名し、そのDNAを取出して、種々の制限酵素で培養して、第24図の制限マップを得た。DNA配列を分析して、プラスミドpMYC073は、41\*抗原の場合にはそのアミノ酸終端を暗号付けしている抗原遺伝子の部分が欠失していることが分った。この欠失部を補うために、pMYC032を酵母BclIとPvuIIで培養し、198番目の塩基対断片(第25図で、塩基対4

た液中に、始めの培養体積の15分の1において解糖調整せ、25℃で10分間熱処理させ、4℃15分間超音波処理した。得られた全菌液を遠心加速度13,000gで10分間4℃において遠心分離し、その上澄み液を可溶性タンパク質分として保存した。沈殿は、20mM Tris pH8.0のEDTAと2%トライトンX-100より成る溶液中で2時間溶解させた。分液して得られた各部分を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分別し、クーマジ青でタンパク質着色試験を行った。新たに、41kDaのタンパク質が、宿菌株およびプラスミドpMYC080のトライトン可溶化分液中に確認された。フエスタン法プロット分析により、このタンパク質は、回復期の家豚の血清と反応することが示された。

#### (実施例11)肺炎病原体の96kDa抗原

分子量96kDa抗原の部分的アミノ酸配列に基いて、下記のオリゴヌクレオチド版(COD829およびCOD830)を合成した。

特開平2-291271 (26)

96kDaアミノ酸配列の一部

COD B29

Ala-Asp-Glu-Lys-Thr-Ser-xxx-Gln-Lys-Asp-Pro-Ser

GCX GAT GAA AAA ACX AG  
C G G TC

COD B30

Thr-Leu-Arg-Ala-Ile-Asp-Phe-Gln-Tyr-Asp-Glu-Asn-Thr

ATA GAT TTT GAA TAT GA  
T C C G C  
C

肺炎病原体遺伝子DNAを、制限酵素で増強し、アロガスゲル電気泳動で分子量の差に応じて分離させ、サザン法プロット分析を行った。COD B29、COD B30は共に、長さ1,400塩基対(長さ1.4kb)のHindIII制限断片、および3,300塩基対(3.3kb)のEcoRI制限断片に重複形成されていることが認められた。

肺炎病原体遺伝子DNAを、HindIIIで増強し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分別し、約1.4kb長さの断片を電気的に溶離さ

せ、HindIIIで増強したベクターpUC9に作製させて、大腸菌感受性の遺伝子ライブラリーを作成した。96kDaの抗原に特異的クローンを見つけるために、複数のライブラリー番号からプラスミドDNAを調製し、HindIIIで増強し、ニトロセルロース中に移行させて、サザン法プロット分析に供し、COD B30によってプローブした。2種のクローン(分離増殖)PMYC092(第27図)とPMYC094は、COD B30に異種結合する1.4kbのHindIII挿入部位を含むものであった。

このPMYC092の挿入個所のDNA配列を分析して、(1)それが、COD B29とCOD B30と類似の領域を有すること、および(2)すべてのアミノ酸が、その1種を除き、下記に示す96kDa抗原に対して決定されるアミノ酸配列に適合するDNA配列から予見できることが判明した。

タンパク質 1  
配列 ) Ala Asp Glu Lys Thr Ser xxx Gln Lys Asp  
クローン 195  
配列 ) ala asp glu lys thr ser ser gln lys asp  
タンパク質 11  
配列 ) Pro Ser Thr Leu Arg Ala Ile Asp Phe Gln  
クローン 205  
配列 ) pro ser thr leu arg ala ile asp phe gln  
タンパク質 21  
配列 ) Try Asp Glu Asn Thr  
クローン 215  
配列 ) tyr asp leu asn thr

さらにアミノ酸配列を再分析した結果では、明確に特定されていないアミノ酸による不適合が考えられる。96kDaの抗原に対して求められたアミノ酸配列は、内部のクローン配列に合致しており、分析とも矛盾しない結果が、タンパク質分解電泳によって引出される断片についても適用できることが分った。2種のクローンのPMYC092とPMYC094を制限酵素で分析すると、

それらの挿入部位が、一見同一であるが、pUC9ベクターに対して、互いに反対向きであることが判明した。

PMYC092は、COD B29、COD B30の何れかに対しても異種結合する予期の長さの挿入部を有すると共に、96kDaの抗原のアミノ酸配列に適合するようなDNA配列を有するので、長さ1.4kb HindIIIの挿入部が、3.3kbのEcoRI断片をクローンするためのプローブとして利用できる可能性があった。肺炎病原体DNAを、EcoRIで部分的に増強し、指数的アロガス勾配分析法によって分子量に応じて分別し、プールされた15,000から18,000対の塩基対断片を、バクテリオファージラムダベクター(ラムダダッシュ)PMYC092にクローンさせ、ランダムに挿入されたDNAラベリングキット(ベーリング社製)を使用して、放射性によるラベル付けを行い、約500個の組換え体菌落の中から、6個の、PMYC092に異種交配された菌落が判別さ

特開平2-291271 (27)

れた。

DNAは、5株のファージから調製され、EcoRIで培養され、ゲル電気泳動法によって分析されて、各菌株は、前述の断片（他の断片の他に）を含むものであった。DNAを、MYCOSと命名した他の組換え体から調製し、制限酵素によって培養し、得られた制限マップは第28図である。

長さ3.3 kbのEcoRI断片をサブクローニングさせるために、ラムダMYCOSを、EcoRIで培養し、EcoRIで培養したベクターpUC9に作用させて、大腸菌K12のJM83菌株に転換させた。3.3 kb長さのEcoRI断片を含む2種の組換え体pMYC095とpMYC096を分離し、それらのDNAを調製し、制限酵素分析を行ったところ、それらの挿入部は、一足同一であるが、その方向は、pUC9ベクターに対して正反対であった。このpMYC095の制限マップは第29図のとおりである。長さ1.4 kbのHindIII断片のDNA配列分析と、ラム

ダMYCOSの制限マップデータによれば、3.3 kb長さのEcoRI断片は、分子量96 kDaの抗原遺伝子の全体を言っていないことが分った。

ラムダMYCOSの制限分析によれば、2.2 kbのEcoRI断片は、3.3 kbのEcoRI断片の近傍にあり、その位置が正しいとすれば、これらの断片は、96 kDaの抗原遺伝子全体を含む程十分に長い。この区域をサブクローニングするために、ラムダMYCOSを、BglIIとSalIで培養し、BglIIとSalIで培養されたpWHA148に作用させて、大腸菌K12のJM83株に転換させた。その1種を第30図のpMYC0118と命名し、これは、予測された長さ（3.0 kb）のBglII-SalIの断片を含むものである。このDNAを調製し、種々の制限酵素で培養して、第30図の制限マップが得られた。

長さ3.3および2.2 kbのEcoRI断片の遺伝情報的位置が、MYCOS内と同一である

ことを示すために、肺炎病原体をサザン法プロット分析に供した。pMYC0118の3.0 kbのBglII-SalI断片（何れもEcoRI断片を含む）か、pMYC095の長さ0.9 kbのEcoRI-HindIII断片（長い方の断片のみを含む）によって認識されるところの、肺炎病原体の長さ20 kbのHindIII断片に異種接合されていることが分った。この3.3および2.2 kbのEcoRI断片が、MYCOS中に存在する断片と異なるとすれば、pMYC0118の長さ3.0 kbのBglII-SalIの断片が、他のHindIII断片に異種接合されている可能性は十分に予測される。

前記のpMYC0118を、酵素BglIIとSalIで培養し、BglIIとSalIで培養されたpMYC096（これは、ベクターに関して反対方向である点以外はpMYC095と同一である）に、リガーゼを使用して作用させて、大腸菌K12のJM83菌株に転換させた。その1種をpMYC0119と命名し、そのDNAを調

製し、種々の制限酵素で培養することにより、第31図の制限マップを作成した。96 kDaの抗原遺伝子の大体の位置が記入されている。

プラスミドpMYC0119は、調製実施例1に記載の方法により、大腸菌（E. coli）の菌株CY15000に転換され、96 kDaの肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘発させる機能のある1種のタンパク質を発現することができる。

以上、この発明の、特にワクチンを生成するために発現されるタンパク質の使用に関して説明したが、発現される種々のタンパク質は、肺炎マイコプラズマ病原体の抗体を判別するための診断用としても使用できる。さらに、発現されるタンパク質は、抗体を誘発させるために使用できると共に、誘発された抗体をワクチンとして使用することも可能である。

この発明は前記各々の実施例の他に、さらに多くの変形および改良が可能であり、これらもこの発明の特許請求の範囲に属することは勿論であ

## 特開平2-291271 (28)

る。

## (発明の効果)

この発明による組成物中の発現伝播体、例えば肺炎病原体の抗原は、病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘起させる機能のあるタンパク質を発現させることができる。

またこの発明によれば、適切なプラスミドを使用して大腸菌等を形質転換すれば、病原体抗原を発現させ、これを利用して病気の予防接種用に応用することが可能となる。

## 4. 図面の簡単な説明

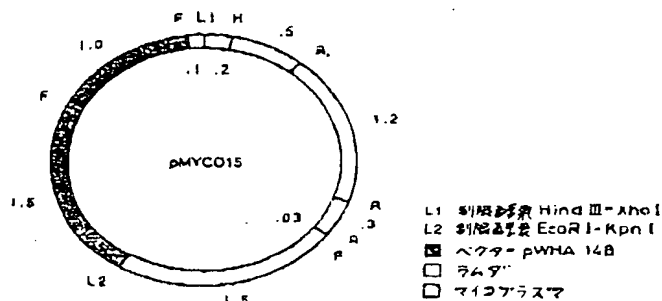
第1図は、この発明による形質転換体pMYCO1の制限マップ、第2図は、転換体pMYCO4の制限マップ、第3図は、転換体pMYCO15の制限マップ、第4図は、転換体pMYCO8の制限マップ、第5図は、転換体pMYCO16の制限マップ、第6図は、74.5 kDa遺伝子の形質転換を示す図、第7図は、B-ガラクトシダーゼのアミノ酸末端配列図、第8図は、プラスミドpMYCO29の制限マップ、第9図は、プ

ラスミドpMYCO31の制限マップ、第10図は、プラスミドpCAM101の制限マップ、第11図は、プラスミドpMYCO32の制限マップ、第12図は、形質転換体pMYCO39の制限マップ、第13図は、形質転換体pMYCO40の制限マップ、第14図は、41 kDa遺伝子の翻訳を示す配列図、第15図は、転換体pMYCO50の制限マップ、第16図は、ベクターM13mp18の制限マップ、第17図は、転換体m13MYCO102の制限マップ、第18図は、M13MYCO102から翻訳するステップを示す説明図、第19図は、転換体m13MYCO107の制限マップ、第20図は、転換体pMYCO116の制限マップ、第21図は、転換体pMYCO56の制限マップ、第22図は、転換体pMYCO91の制限マップ、第23図は、転換体pMYCO91の他の実施例の制限マップ、第24図は、転換体pMYCO73の制限マップ、第25図は、プラスミドpMYCO32の制限マップ、第26図は、プラスミ

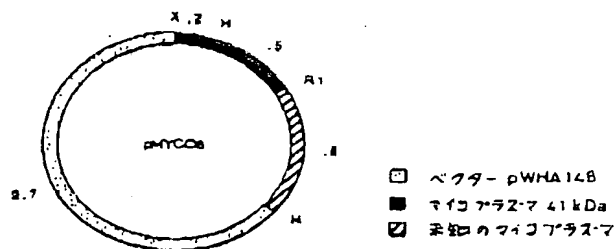
ドpMYCO80 4.639 bpの制限マップ、第27図は、プラスミドpMYCO92の制限マップ、第28図は、フージから調製されたDNAの制限マップ、第29図は、λMYCO5からの転換体pMYCO95の制限マップ、第30図は、λMYCO5からの転換体pMYCO118の制限マップ、第31図は、pMYCO118からの転換体pMYCO119の制限マップ、第32図は、分子量36 kDaのDNAの制限マップ、第33図は、分子量41.6 kDa遺伝子の翻訳説明図、第34図は、分子量95.6 kDaのDNAの制限マップである。

(以下の各々は制限酵素を表わす) H---Hind III、R---EcoRI、X---Xho I、F---Fsp I、A---Acc I、A. A---Asu II、C---Cla I、B---Bgl II、P---Pst I、P f---Pflm I、A f---Afl II、S---Sfi I、R v---EcoRV、T---Tth I。

第3図

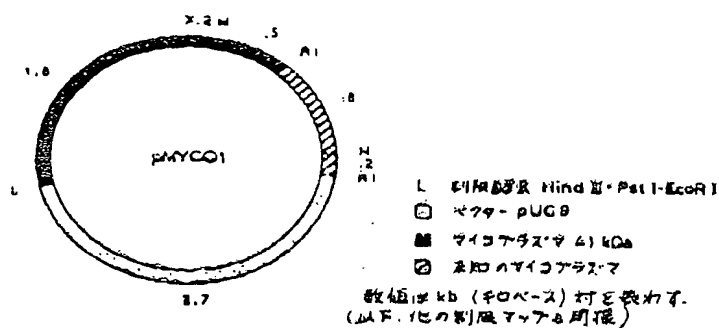


第4図

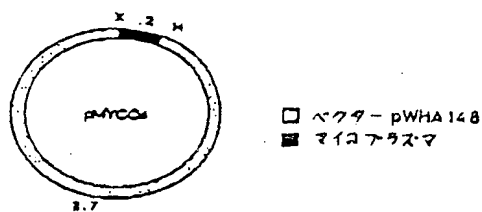


特開平2-291271 (29)

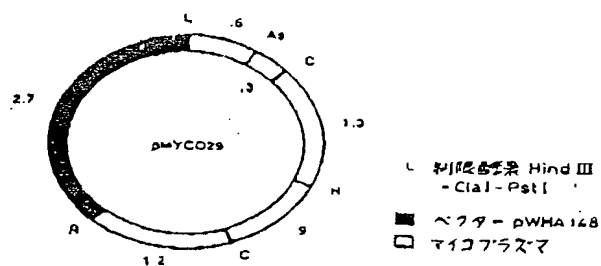
第 1 図



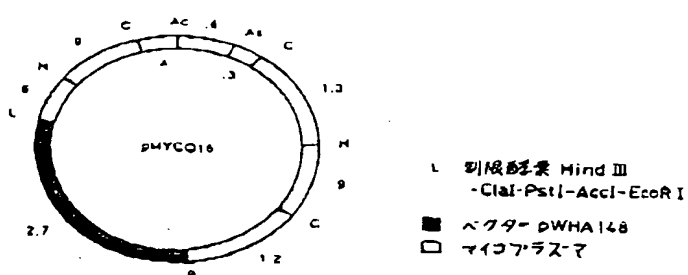
第 2 図



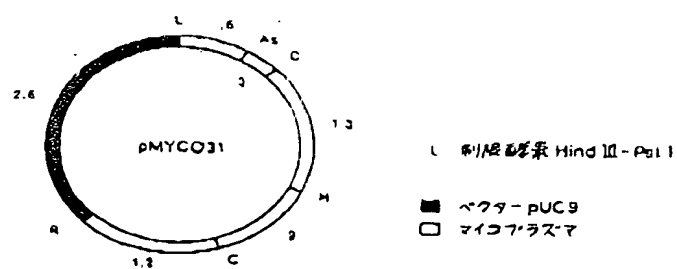
第 8 図



第 5 図



第 9 図



特開平2-291271 (30)

図面の説明

第 6 図 - 1

1  
met ala lys glu ile ile leu gly ile asp leu gly thr thr asn  
ATG GCA AAA GAA ATC ATT TTA GGA ATC GAC GTT GGA ACA ACA AATC  
10  
ter val val ala ile ile glu asp gln lys pro val val leu glu  
TCA GTT GTT GCA ATT ATT GAA AAT CAA AAA CCF GTC GTT CTC GAT  
20  
asn pro asn gly lys arg thr thr pro ser val val ala phe lys  
AAT GGC AAC GGA AAA AGA ACA ACT CCA TCC GTC GTC GCT TTT AAA  
30  
asn asn glu glu ile val gly asp ala ala lys arg gln leu glu  
AAC AAT GAA GAA AAT GTC GGG GAT GCA GGT AAA AGA CAA CTT GAA  
40  
thr arg pro glu ala ile ala ser ile lys arg leu met gly thr  
ACT AAC GCA GAA GCA ATC GCT TCA ATT AAA AGA TTA ATG GGA ACT  
50  
asp lys thr val arg ala asn glu arg asp tyr ile pro glu glu  
GAT AAA ACA GTT GGT GCA AAT GAA AGA GAT TAT ATT GCT GAA GAA  
60  
ile ser ala lys ile leu ala tyr leu lys glu tyr ala glu lys  
ATC TCG GCA AAA ATT CTT GCT TAT TTA AAA GAA TAT GCT GAG AAA  
70  
lys ile gly his lys val thr lys ala val ile thr val pro ala  
AAG ATE GGT CAT AAA GGA ACA AAA GCA GTA ATT ACA GTA GCT GCT  
80  
tyr phe asp asn ala gln arg glu ala thr lys asn ala gly lys  
TAT TTT GAC AAT GCT CAA GGT GAG GCA ACA AAA AAT GCT GGA AAA  
90  
ile ala gly leu gln val glu arg ile ile asn glu pro thr ala  
ATC GCT GGA TTA CAA GTA GAA AGA ATT ATA AAT GAA GCA ACA GCG  
100  
ala ala leu ala phe gly leu asp lys thr glu lys glu met lys  
GCC GCA CTT GCT TTT GCG CTT GAT AAA ACT GAA AAA GAA ATG AAA  
110  
val leu val tyr asp leu gly gly thr phe asp val ser val  
GTT CTT GTC TAT GAC TTA GGT GGG GGA ACT TTT GAT GTC TCA GTT  
120  
leu glu leu ser gly thr phe glu val leu ser thr ser gly  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190

図面の説明

第 6 図 - 2

TTA GAA TTA TCC GGT GCA ACC TTC GAA GTT TTA TCA ACA AGT GGT  
200  
asp asn his leu gly asp asp leu asp asn glu ile val asn  
GAT AAT CAT TTA GGT GGG GAT GAC TGG GAT AAT GAA ATT GTA AAT  
210  
trp leu val lys lys ile lys glu val tyr asp phe asp pro lys  
TCA CTT GTT AAA AAA ATC AAA GAA GTA TAT GAT TTT GAT CCA AAA  
220  
ser asp lys met ala leu thr arg leu lys glu glu ala glu lys  
AGT GAT AAA ATG GGG CTT ACA AGA CTT AAA GAA GAG GCT GAA AAA  
230  
thr lys ile asn leu ser asn gln ser val ser thr val ser leu  
ACC AAA ATT AAT CTT TCA AAT CAA AGT GTT TCT ACA GTT TCT CTA  
240  
pro phe leu gly met gly lys asn gly pro ile asn val glu leu  
CCA TTT TTA GGA ATG GGC AAA AAC GGG GCG ATT AAC GTT GAA CTT  
250  
glu leu lys arg ser glu phe glu lys met thr ala his leu ile  
GAA CTT AAA AGA TCA GAA TTT GAA AAA ATG ACT GCC CAT TTA ATC  
260  
asp arg thr arg lys pro ile val asp ala leu lys gln ala lys  
GAT AGA ACT CGC AAA CCA ATT GTT GAT GCT CTA AAA CAA GCA AAA  
270  
ile glu ala ser asp leu asp glu val leu leu val gly gly ser  
ATT GAG GCT TCA GAT CAT GAT GAA GTT CTC CTT GTA GGT GGA TCA  
280  
thr arg met pro ala val gln ser met ile glu his thr leu asn  
ACA AGA ATG CCA GCT GTT CAG TCA ATG ATT GAG CAT ACT TTA AAT  
290  
lys lys pro asn arg ser ile asn pro asp glu val val ala ile  
AAA AAG CCA AAT CGT TCA ATT AAT CCT GAT GAG GTA GTC GCA ATT  
300  
gly ala ala ile gln gly gly val leu ala gly glu ile ser asp  
GGT GCT GCA ATT CAA GGG GGG GTT CTA GCT GGA GAG ATC AGT GAT  
310  
val leu leu leu asp val thr pro leu thr leu gly ile glu thr  
GTT CTA CTT TTA GAT GTT ACT CCT TTA ACT TTA GCA ATT GAA ACT  
320  
leu gly gly ile ala thr pro leu ile pro arg asn thr thr ile  
TTA GGT GCA ATT GCA ACA CCT TTG ATT CCA AGA AAT ACA ACA ATT  
330  
pro val thr lys ser gln ile phe ser thr ala glu asp asn gln  
340  
350  
360  
370  
380  
390  
400

第 6 図 - 3

図面の説明

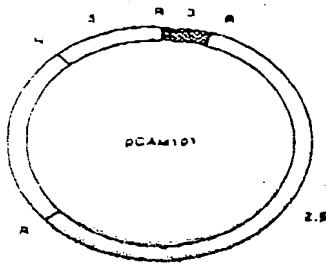
CCG GTA ACA AAA TCA CAA ATT TTC TCA ACA GCT GAG GAT AAT CAA  
 410  
 thr glu val thr ile ser val val gln gly glu arg gln leu ala  
 ACC GAA GTA ACA ATT TCT GTT GTC CAA GGT GAA CGT CAA CTT GCA  
 420  
 ala asp asn lys met leu gly arg phe asn leu ser ser gly ile glu  
 CCG GAT AAT AAA ATG TTA GGT CGC TTT AAT TTA TCA GGA ATT GAA  
 430  
 ala ala pro arg gly leu pro gln ile glu val ser phe ser ile  
 440  
 GCT GCT CCA CGA GGT CTT CCC CAG ATT GAA GTT AGT TTT TCA ATT  
 450  
 asp val asn gly ile thr thr val ser ala lys asp lys lys thr  
 GAT GTC AAC GGG ATT ACA ACG GTT TCA GCA AAA GAT AAA AAA ACC  
 460  
 gly lys glu gln thr ile thr thr lys asn thr ser thr leu ser  
 470  
 GGC AAA GAA CAA ACA AAT ACA ATT AAA AAT ACT TCA ACT TTA TCA  
 480  
 glu glu glu ile asn lys met ile gln glu ala glu glu asn arg  
 490  
 GAA GAA GAA AAT AAT AAG ATG ATT CAG GAA GCC GAA GAA AAT CGT  
 500  
 glu ala asp ala leu lys lys asp lys ile glu thr thr val arg  
 GAA GCT GAT GCT CTT AAA AAA GAC AAA ATC GAG ACA ACA GTT CGT  
 510  
 ala glu gly leu ile asn gln leu glu lys ser ile thr asp gln  
 520  
 GCG GAA GGG CTT ATT AAT CAA CTT GAG AAA TCA ATA ACT GAT CAA  
 530  
 gly glu lys ile asp pro lys gln lys glu leu leu glu lys gln  
 540  
 GGT GAA AAA ATT GAT TCA AAA CAA AAA GAA TTA TTT GAA AAA CAA  
 550  
 ile gln glu leu lys asp leu leu lys glu asp lys thr asp glu  
 ATT CAA GAA TTA AAA GAT CTT CTA AAA GAA GAT AAA ACT GAC GAA  
 560  
 leu lys leu lys leu asp gln ile glu ala ala ala gln ser phe  
 570  
 TTA AAA TTA AAA TTA GAC CAA ATT GAA GCA GCT GCG CAA TCT TTT  
 580  
 ala gln ala thr ala gln gln ala asn thr ser glu ser asp pro  
 590  
 GCG CAG GCA ACC GCG CAG CAA GCA AAT ACA TCT GAA TCT GAT CCA  
 600  
 lys ala asp asp ser asn thr ile asp ala glu ile lys gln asp  
 AAA GCT GAT GAT TCA AAC ACA ATT GAT GCT GAA ATC AAG CAG GAT  
 610  
 GCT

第 7 図

1  
 met thr met ile thr asn ser ser ser val pro gly  
 10  
 atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gca ccc ggg  
 tac tgg tac taa tgc tta agc tcg agc cat ggg ccc  
 ----->  
 pUC18  
 EcoRI  
 20  
 asp pro leu glu ser thr cys arg his ala ser ser  
 gat cct cta gag tcg acc tcg agg cat gca agc tcc  
 cta gga gat ctc agc tgg acg tcc gca cgt tcg agc  
 ----->  
 SphI  
 30  
 ARG PRO GLY ALA ARG ASP LEU GLY PRO ASP ARG CYS  
 AGG CCT GCG GCG CGA GAT CTC GCG CCC GAT CGA TGC  
 TCC GGA CCG CCC GCT CTA GAG CCC GGG CTA GCT ACG  
 ----->  
 pMH148 addition  
 40  
 ARG GLY ASP ILE ALA ARG GLY SER LEU ALA  
 CCG GCG GAT ATC GCT CGA GGA agc tcg gca  
 GCG CCG CTA TAG CTA GCT CCT TCG AAC cgc  
 ----->  
 XhoI HindIII  
 50  
 pUC18

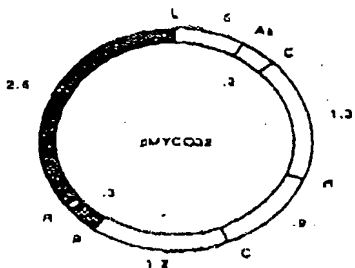
特開平2-291271 (32)

図 10



□ 7-9233 pJC 27  
■ T 176

図 11



□ pUC 9  
■ T 176

図 12

図 13

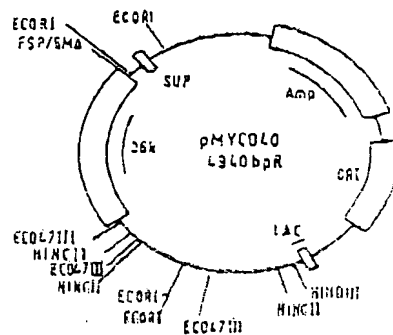
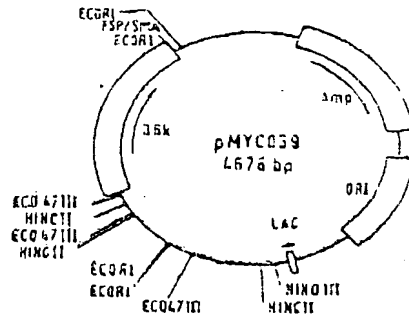


図 14

第 14 図

1  
met asp lys phe arg tyr val lys pro gly ala ile met ala lys  
ATG GAC AAA TTT CCG TAT GTA AAG CCI GGT CAA ATT ATG GCA AAX  
10  
20  
asp glu glu met ile arg phe leu asp ile as gly ala leu leu  
GAT GAA CAA ATG ATT CGC TTT CTT GAT ATT GAT GGT AAT CTT TTA  
30  
40  
ser ser thr val phe gly pro ile asp glu thr asn asp ile arg  
TCT TCA ACT GTT TTT GGA CCA ATC GAC GAA ACA AAT GAT ATT CGC  
50  
60  
leu ser lys gln glu ile lys lys ala tyr glu phe met val leu  
TTA TCA AAA CAG GAA ATC AAA AAT GCT TAT GAA TTT ATG GTE TTA  
70  
80  
ser arg gln gln asp thr tyr met thr gln leu arg gln gly  
TCT CGC CAA CAA GAT AGC TAT ATG ACA CAA CTA CAG CCA CAA GGT  
90  
arg met leu thr phe ala pro asn phe gly glu ala leu gln  
AGA ATG TCG ACT TTT GGC CCT AAC TTT GGT CAA GAA GCT CTT CAA  
100  
val ala ser gly met ala leu thr lys asp asp trp phe val pro  
GTA GCC TCA GCG ATG GCG CTA ACA AAA GAT GAC TGA TTT GTC CCA  
110  
120  
ala phe arg ser asn ala thr met leu tyr leu gly val pro met  
GCT TTT CGT TCA AAT GCA ACA ATG TTA TAT CTT GCG GTG CCA ATG  
130  
140  
ile leu gln met gln tyr trp asn gly ser glu lys gly asn val  
ATC TTG CAA ATG CAA TAT TGA AAT GGT AGC GAA AAA GGT AAT GTA  
150  
160  
ile pro glu asn val asn val leu pro ile asn ile pro ile gly  
ATT CCC GAA AAT GGT AAT GGT TTA CTT ATT AAC ATT CCC ATC GGA  
170  
180  
thr gln phe ser his ala ala gly ile ala tyr ala ala lys leu  
ACG CAG TTT TCC CAT GCT GCC GGA ATT GCT TAT GCA GCA AAA CTA  
190  
thr gly lys lys ile val ser met ser phe ile gly asn gly gly  
ACA GGT AAA AAA ATA GTC TCA ATC AGT TTT ATT GGA AAC GCG GCA  
200  
thr ala glu gly glu phe tyr glu ala leu asn ile ala ser ile



特開平2-291271 (33)

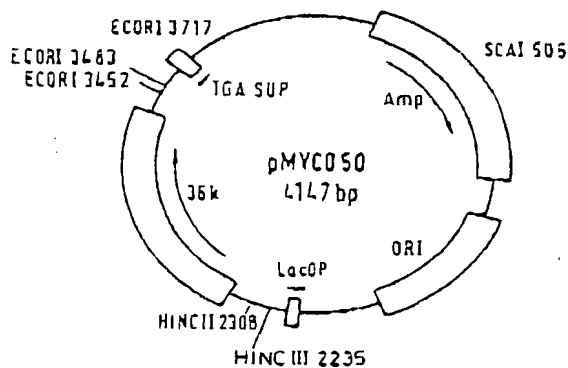
## 第 14 図 - 2

ACT GCC GAA GGC GAG TTT TAC GAA GCG CTA GAG ATT GCA AGT ATT  
 200  
 TCG Tys TRP pro val val phe cys val asp asn asn gln trp ala  
 TGA AAA TGA CCA GTT GTT TTT TGC GTA AAT AAC AAT CAA TGA GCA  
 210  
 ile ser thr pro asn lys tyr glu asn gly ala ser thr ile ala  
 ATT TCA ACC CCA AAT AAA TAT GAA AAC GGT GGC TCA ACA ATT GCT  
 220  
 ala lys ala met ala ala gly ile pro gly ile arg val asp gly  
 GCA AAA GCA ATG GCA GGC GGA ATT CCT GGA ATT GGT GTA GAC GGA  
 230  
 asp asp leu leu ala ser tyr glu val ile lys glu ala val asp  
 AAT GAC CTT TTA GCT TCG TAT GAA GTA ATC AAG GAA GCT GTT GAT  
 240  
 tyr ala arg ser gly asn gly pro val leu val glu phe val thr  
 TAT GCT CGT TCG GGA AAC GGT CCT GTT GGT GGT GAG TTT GTA ACT  
 250  
 leu arg gln gly val his thr ser ser asp asp pro arg ile tyr  
 TGA CGT CAA GGT GTT CAT ACC TCT TCT GAT AAT CCA CGA ATT TAT  
 260  
 arg thr val glu glu lys glu his glu lys trp glu pro met  
 CGT ACT GTT GAA GAG GAA AAA GAA CAC GAA AAA TGA GAA CCA ATG  
 270  
 ala arg ile glu lys tyr met phe asp arg gly phe ile asp ser  
 CAC CGG ATT GAA AAA TAT ATG TTT GAC CGC GGA TTT ATT GAT TCT  
 280  
 thr asp ser gln pro asn leu arg trp ser ala cys asp cys gln  
 ACC GAT AGT CAA CCT AAT TTG AGA TGA AGC GCT TGC GAT TCT CAA  
 290  
 arg asn leu trp lys ile ser lys trp ala asp val asn asn trp  
 AGA AAC TTA TGA AAA ATC TCT TGT TGG GCT TGA GTC AAC AAT TGA  
 300  
 trp asn phe arg ser tyr leu gln gly phe thr thr arg thr trp  
 TGA AAT TTT CGA TCA TAC CTA CAA GGT TTT ACC ACC AGA ACT TGA  
 310  
 arg thr lys thr arg ser ala trp ile phe GCT  
 AGA ACA AAA ACA AGA AGC GCT TGA ATT TTT GAA  
 320  
 Translated Mol. Weight : 92157.44

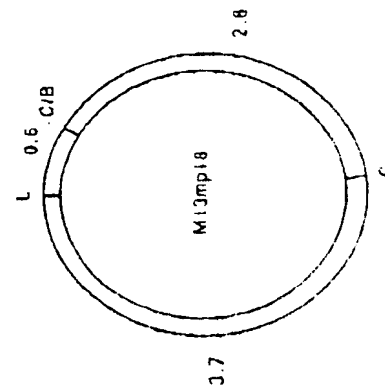
図面の浄化

図面の浄化

## 第 15 図



## 第 16 図

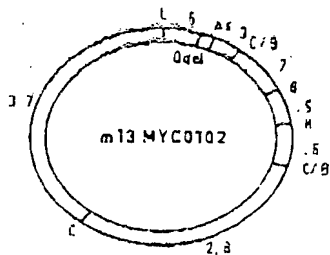


L 制限酵素 Pst-Hind III 4 他  
 C/B 制限酵素 ClaI-50bp-Bg III

特開平2-291271 (34)

図面のつぎ

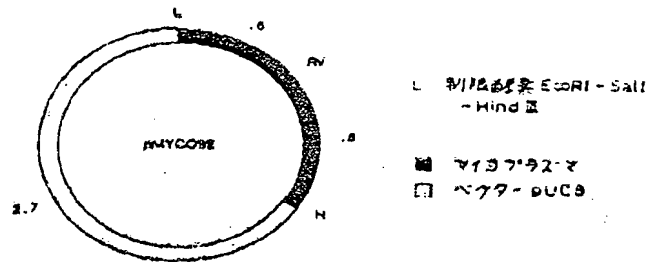
第 17 図



C/B 制限酵素 ClaI, BglII  
互いに接近

- ベクター M13 mp 18
- プラスミド pMYC031

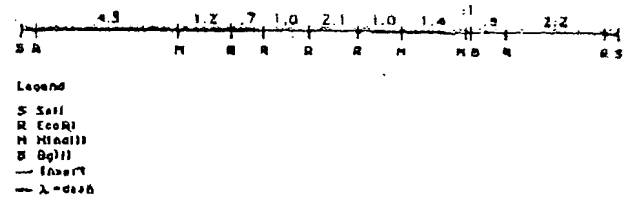
第 27 図



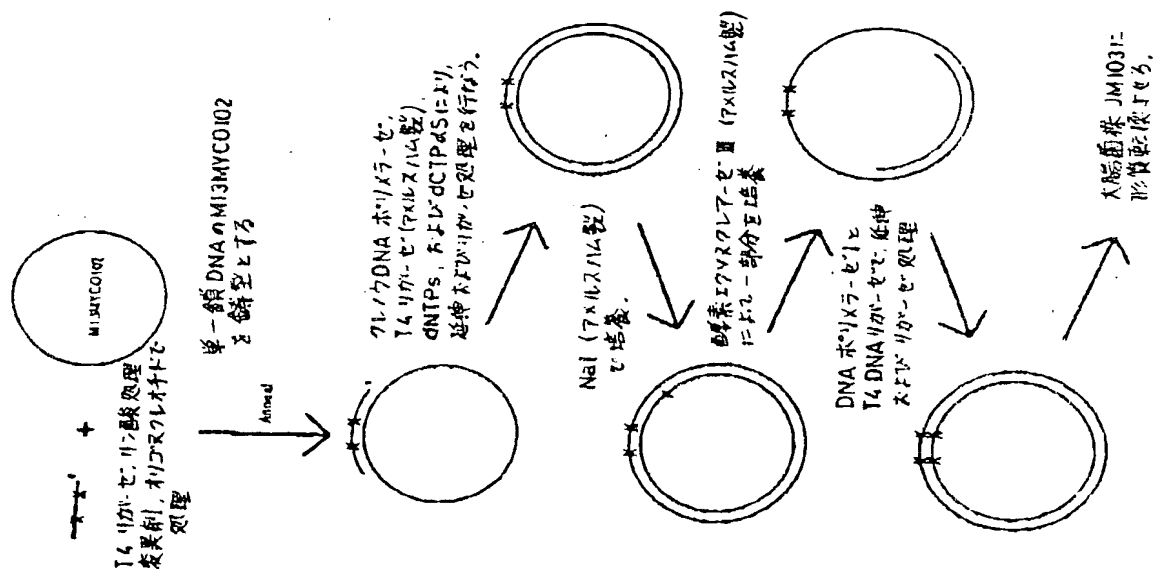
L 制限酵素 EcoRI - SalI  
- Hind III

- MY37-2-2
- ベクター pUC9

第 28 図

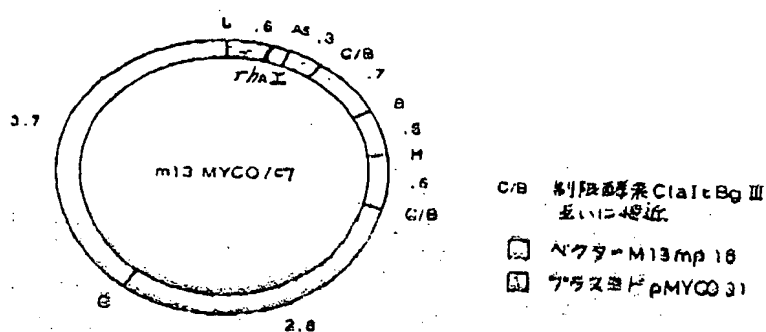


第 18 図

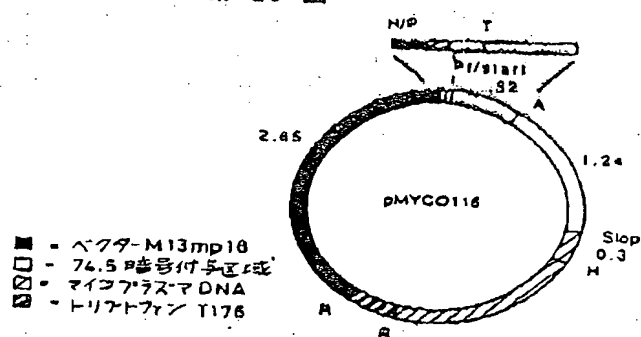


特開平2-291271 (35)

第 19 図

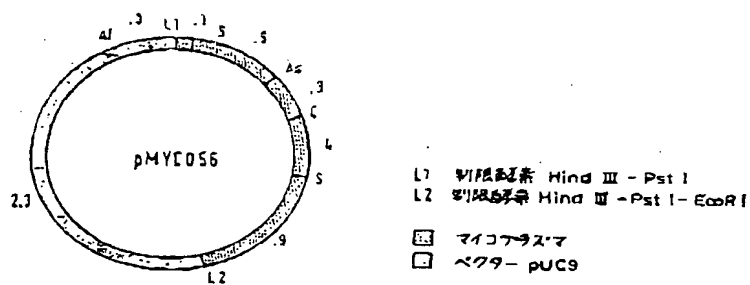


第 20 図

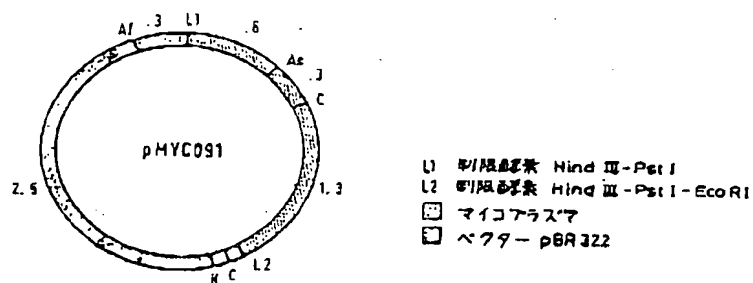


図面の浄書

第 21 図

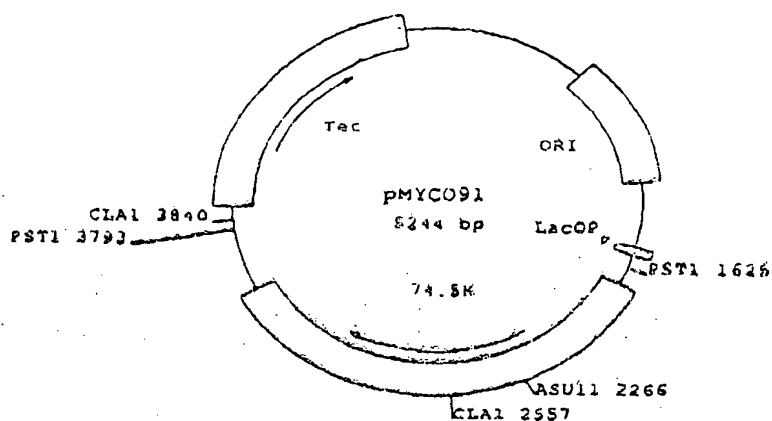


第 22 図

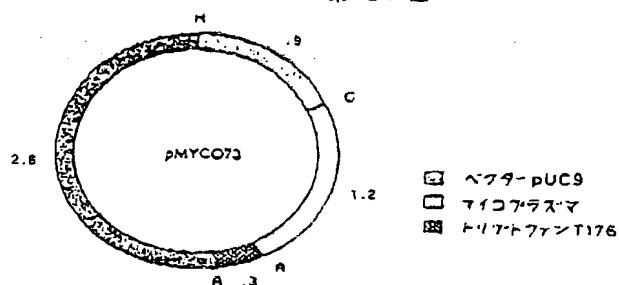


特開平2-291271 (36)

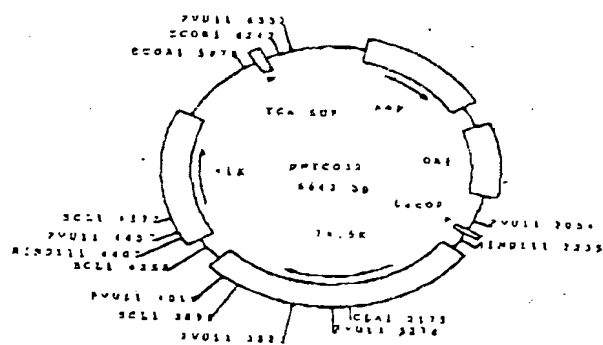
第 23 図



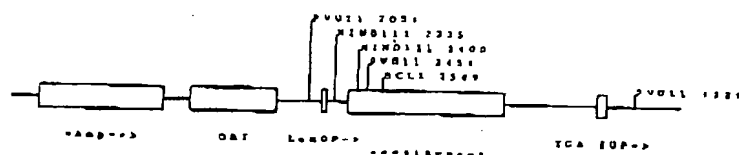
第 24 図



第 25 図

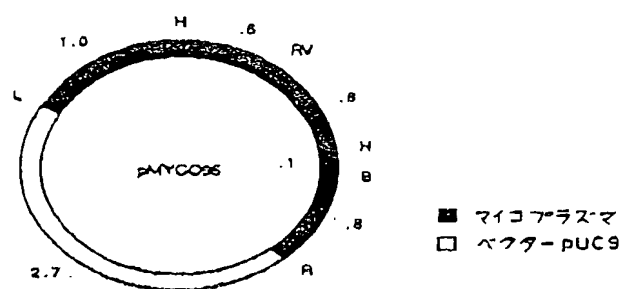


第 26 図

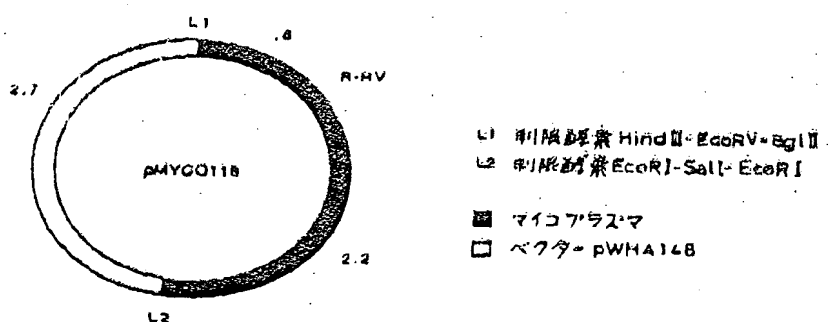


特開平2-291271 (37)

第 29 図



第 30 図



図面の作り

第 33 図

TRANSLATION OF 41<sup>st</sup> GENE SEQUENCE OBTAINED TO DATE

```

1 10
acc ala lys gln asp phe tyr lys ile leu gly val glu lys ser
ATG GCA AAA CAA GAT TTT TAT AAA ATT CTG GGA GTT GAA AAA TCA

20 30
ala ser leu chr glu ile lys lys ala tyr arg asn leu val asn
GCA TCA CTA ACA GAA ATA AAA AAA GCT TAT CGA AAT TTA GTA AAT

40 50
ile tyr his pro asp lys asn chr lys lys ser ala glu glu gln
ATT TAT CAT CCT GAT AAA AAT ACA AAA AAA TCA GCT GAA GAA CAA

60 70
lys gln ala glu ala lys phe lys glu ile gln glu ala tyr glu
AAA CAA GCT GAG GCC AAA TTT AAA GAA ATC CAG GAA GCC TAC GAA

80 90
ile leu ser asp glu thr lys arg lys gln tyr asp lys phe gly
ATT TTA TCT GAT GAA ACA AAG CGA AAA CAG TAC GAT AAA TTC GGT

100 110
his ala ala phe asp gln gln phe gly gly gly ser ser gly phe
CAT GCC GCT TTT GAT CAG CAA TTT GGT GGT GGG TCT AGT GGC TTT

120 130
ser gly phe asp phe gly asp ile phe ser ser phe thr ser gly
TCA GGA TTT GAT TTT GGC GAT ATT TTT TCA AGT TTT ACC TCT GGT

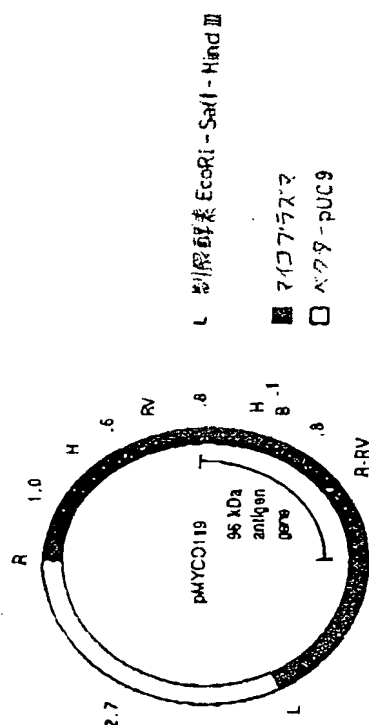
140 150
phe gly phe gly gly ser gln glu gln lys tyr ser arg pro leu
TTT GGT TTT GGC GGC TCA CAA GAA AAA TAT AGT CGT CCT CTT TTA

160 170
lys gly glu asn phe gln ala lys ile tyr ile ser phe ile glu
AAG GGC GAA AAT TTT CAA GCT AAA ATT TAT ATC AGT TTT ATC GAG

180 190
ser ile leu gly lys glu ile ser gln lys leu thr lys tyr asp
TCA ATT CTT GGA AAA GAA ATC TCC CAG AAA TTA ACA AAA TAC GAT

```

第 31 図



## 第 32 図 - 1

Restriction Map in DNA 36k 5.24 89 (length = 1080)  
from the 'usr2/orp1/ib/Snoiso' file.  
Translation shown as Frame 1.

Sequence is LINEAR.

MetAlaSerSerAspLysAlaLeuAlaAsnProGlyAlaValIleAsnAlaLeuAsp  
ATGGCAATTCATATAAATCGCTCTATATACCTCGCTGAGTACAAATGCTCTTCA  
TACCTTTAAGTCTATTATAGGAGATATAGTACCCAGCTCAATGTTACGAGACTA  
LeuKcPheGluLysAspSerArgValValLeuTrpGlyGluAspAlaGlyPheGluGly  
ATAATGATGAAAGGATCTCGCTGTGTCTCTGGGGCGAAGATGCCGATTTGAGGT  
ATTATGATGCTTTCTTAAAGGCGACAGAGATCCCGCTCTACGGCTTAACATTTCCA  
GlyValPheArgAlaIleGluGlyLysTrpGlyIleGluArgValAsp Asp  
GGGGTTTTCGAGCAATGAGGCTCTCAAGAGAAATACGGATTCAGCGCTGAGAT  
CCCAAAAGCTGCTTATCTTCCGAGGTCTCTTATGCCCTAACTTCCGAGACTTA  
P39: ASP300, 143 bps, 168 AFD: ML01.  
SerProIleHisGluAlaSerIleCysGlyValGlyValGlyValAlaIleAlaGlyLeu  
TCGCAATTCCTGAGCTTCAATTTGCGAGCTGGAGTGGAGCGAGCAATTCGAGACT  
AGCGGTTAAGCACTCGAGTTAAACCTCCCACTCAGCTCTGCTGTTAAGCACTGAA  
217: smel mml.  
Arg SerLeuLysCysSerPheLysAspPheProIleLeuHisPheAsnAspPheLeu  
CGT63ATCGTTGAATGAGTTCAAGGATTTTCTTATCTGCTCAATTCACACACTTTTG  
GCA367AGCACTTACCTCAAGTCTCTAARGGATAGGAGCTTAAGTCTTGAANAAC  
PheMetGlnLeuValIleGluThrValLeuValGlyValLeuValPheArgTrpCys  
TTCATGCAAGCTGCTTATCGAACCTCTCTCGAGCTGGTTAGTGTCTCGATGATGC  
AACACGCTGAGCAATAGCTTTGGCAAGGCTCAGCCAAATCACAAGGCTACCATTTAGC  
319: ASP700.  
GluCys Trp ValValLeuGlyLeuLeuAsnTrpIleProLysGlnLeuLysHis  
GATTCG36A1GGTGGGTAGGCTCTTGAACCACTTCCGAGCAATTCAGGAC  
CTTACGAGCTACCGACCACTTCCGAGCACTTGGTGAAGCTTCTTACCTTCTG  
361: BSM1, 385 9AH1.  
PheLeuHisIlePheLeuAspCysTrpProLysGlnProLeuHisIleGln  
TATTCGCAATATCTTGGAGTAAAGTGGTGGTCTTCAACCTTATGATACAA506  
AAAAAGCTGTATAGGAGCTGATTTTTCACCACTACGAGCTTGGGGAATATATGTTACC

図面の説明

図面の説明

## 第 32 図 - 2

481 CAGTCAAACTTTAGTTCGCCAATTAATTTTCGCTTAAAAAATTACCONAAATTA  
GTAGTTAGAAATCAGCGCTTAAATTAAGAAGGCAATTTTATAGGCTTTTAAAT  
AsnGlnIleGluAsnLeuSerThrLysIleThrAsnPheAlaAspGlnLysThrSer  
541 AATCACARATGAAATTTATCAAAATATACAAATTTTTCGCTGATGAGAGCAGC  
TTAGTTGTTTAACTTTAAATAGTTGTTTAAATGTTTAAAGCGACTACTTTTGTTCG  
595 (ch112).  
SerGluLysAspProSerThrLeuArgAlaIleAspPheGlnLysAspLeuAsnThrAla  
601 AGCCAAAGACATCCATCACTTAAGGCTTATTTTCCATAGCATTAATATAGCAGC  
TCGGTTTCTAGGAGTATGAGATCTCGATACCTAAGGTTATGCTTAAATTAATGTCG  
609 XH011, 648 ORA1.  
ArgAsnProGluAspLeuAspIleLysLeuAlaAsnTrpPheProValLeuLysAsnLeu  
661 CCAATCTCGAGATTTAGATATAAGCTTGTATTAATTTTCCAGTACTTAAGAATTA  
GCTTAGGACTCTAATCTATATTTCCAGGATTAATAAAGGTCATGATTTTAAAT  
667 CYN1, 605 HND111, 705 SCA1.  
IleAsnArgLeuAsnAlaProGluAsnLysLeuProAsnAsnLeuGlyAsnIlePhe  
721 ATACAGACTAATTAATGCTCTGAGATAAATACCTAATAATTAAGTATATATTTT  
TATTTGCTGATTAATAGGAGCTCTTATTAATGATTAATTAATCTATATTAATAA  
772 SSP1, 778 ORA1.  
LysPheSerPhe LysAspSerSerThrAsnGlyValSerIleGlnAsnGlnPhe  
781 AAAATTAGCTTGAAGAGATGTTCACTAATCAATATGTAAGTATCCAGAGCAAAAT  
TTAATCGAACCTTTCTTCAAGTGTGATTTAGTATATACATTAAGCTTCTGTTAA  
ProSer PheLeuLysAlaAspLeuSerGlnSerAlaArgGluIleLeuAlaSerPro  
841 CCTTCGCTTTTAAAGCAGATCTTATCAAGCTGCCGTGAATTTTAGTATGCCA  
GGAAGCGAATAAATTTCTGATAGATCAGTTTCACGGGCACTTAAPATCGATCGGT  
852 ORA1, 861 BGL1 XH011, 892 RHE1.  
AspGluValGlnProValIleAsnIleLeuArgLeuMetLysLysAspAsnSerSerLys  
901 GATGAGCTCAGCAGTATTAAGATTTAAGATTAATGAAAGAAAGATAATCTTCTTA  
CTACTTCAAGTCGGTCAATATGTAATTTCTAATTTCTTCTTATTAAGAGATAA  
933 ASH1.  
LeuAsn GluAspPheValAsnAsnLeuThrLeuLysAsnMetGlnLysGluAsp  
961 TTGCTAATTTGAGGAGTATTTGTTAATAATTAACACTGAAATATGCAAGAGAGAT  
AAAGATTTAAAGCTCAGAACATTAATAATGCTGCTTTTATACGTTTCTTCTTA  
1020 ORA1.  
LeuAsnAlaLysArgSerLysSerCysLeuProIleSerSerArgTrpCysIleArg  
1021 TTAATGCCAAAGGTCAAATCTTCTGCTATGAATTTCTAGCAGATTAATAAGCTCGC  
AATTTAGGTTTCCAGTTTAGAGAGACGATATTAAGATCGTCTAATAATTTAGGCC  
1076 NND1.  
IlePheSerArgGlnGluIleGlnSerLysLysSerGlnIleSerLys LeuAsn



第 32 圖 - 5

2472 base, 2460 base,  
2496 spec.

AlaThrGlnbP Pro GlySerLeuLys GlyCysIleGluLysAlaPro  
2521 GCACCTCCAGACGCCGAGGGGACATGAAACACAGCTGAAAGAGGTGAGGAGACCTCT  
CGGTGGGTTACTATGCGGCTCCCTCCAGATTTGGTACGATTCTTCACATCCCTCGAGGA  
2522 TGGT, 2523 AAAATAGTAT, SAGA,

AAGACGCTGGTGTATTA GATTATCGSSTGGCTGTTATAGTGCTGTCGTC  
 ATCAGGTGTAAGAAGCAAGGGCTCCCTCATGAGGGGAAGAAGCAGAAAGACTCT  
 TTAGTTCACATTTTTCGTGCCAAGAGGAGGATGCTCCCTTTTCGCTCTCTTCATGAGA

↓

2603 MGRI.

[illegible][illegible][illegible]

2960 111117,  
G57116A1C76AT1AACTAATACATCACTTACATAAGTTCCTTCAGGACACACCTAGC  
CAAACTAGACACAACTTTCATTTAGTCAAAATGATGACGACAGCTCTTTTTCGATC  
TytlenGlutendileofactenpafitsyleuflleGlnAlasertoufoueserile

9461m Gln100 LeuDP Brophaser ProfileVasferArg1asferArg  
TTTCAGAGCGAATCACTTCATGATGAGATCTTCTAGCTATGACGCA  
3001 AAGTTCCTGTTGATTGAACTACTCTAGACGCGGATCACTACGATANTGCT  
3027 [C]01, 3046 ACC1 H1001A SA1, 3048 85045

**061**

CTCTAGGTCGTCAAGCTTGGACATCG  
TGACTCTCTCCTCATCAACCTG

*ProteinlyneGln16\_M17g.*

JOSE ESTE. JOSE MSPPT SPRT. JOSE HINGUL.

## 図面の行次

第 34 页 - 1

Restriction Map in DNA 96.Skgencomp (length = 3087)  
from the 'usr2/arp/lib/Smolno' file.  
Translation shown at frame 1.  
Sequence is LINEAR.

MetSerLysLysSerLysIhrPheLysIleGlyLeuIhrAlaGlyIleValGlyLeuGly  
ATGAGTAAAGATCAAAACATTTAAATTTGGTTGACTCGGGAAATGTGGCTTGGG  
TACTCATTTTGTAGTTTTCATATAATTTTAAACCAACTGACGGCCCTAACAACTCAAGACT

ValPheGlyLeuThrValGlyLeuSerSerLeuAlaLysIythrGSerGluSerProArg  
GTTTGGCTAACTTCGGACTTAGACCTGGCAAAATACAGTCAGAAAGTCACAGA  
CAAAAACAGCATTCAGACGCTGATGCTGACCCGTTTATGCTAGCTTTCAGTGCT

Lys11eAtA3aAsp2heAtA1sLys9vL1SerThrLeuAlaPheSerProTyrAlaIaphe  
ANGATTGCAGATGATTTCCGCGAAGGTTCACACATAGCTTTAGTCCGTTGCTTT  
TTTCAAGCTTTACTAAGCCGCGTTTCAAGTGTGATCGAAATCAGGANTACGAAAT

GluThrAspSerArgPyrLysIleValLysArgOP LeuValAspSerAsnAsnIle  
 AGACG GATTCGATATAAATAGTCAAAAGTGGCTAGTTCATACACATAT  
 CTCTCCACACAGACAAATATTTATCAGTTTCCACGATGACAAAGATATGTATAA

ArgA<sub>1</sub>N<sub>1</sub>LysGluLysValIleAspSerPheSerPheThrLysAsnGlyAspGlnLeu  
AGAATAAAGAAAAGTATGATCTCTTCTTTTACTAAACAGGTCATCAGTAA  
TCTCTATATCTCTTTTCAATACAGCAAGCAAGCAAAATGATTTTGCCACTAGTCAAT

307 ASH, 318 KH011, 312 STYL.

Blv11elPpTcAaGpVatAaNgI nAsnPhcLysValLysPhcGlnAlaLeuGlnLys  
AAAAATATCCCTGATGATGATCATCAAAATTTTAAAGTAAATTTTCAGCATATACAAAA  
TTTTTAATAGGAATCTACAGTAACTTTTAAATTCATTTTAAAGTCGGTAATGTTTTT

euKsAsnGlyAspIleAlaLysSerAspIleIleTyrGluGlnThrValAlaPheAlaLys  
TTCATATGCGATATGCCAAATCTGATATTATGAGCAACACAGTCTTTTGGCAAA  
CAACAGATATACCACTATACCGTTTAGPCTATAAATACCTGTGTTCACAGAACAGCTTT

GIINSEFA:nienvleuValAlOGlOPhAsnPheserLeuylslyslleThrGlutylsleu

## 図面の浄書



## 第 34 圖 - 2

[illegible]

第 34 页 - 3

1081	AFTTTCCTGGGACACAGAGATCCAGTATACAAAGTCAGAAATTAGTAAAGTITTAAT TAAAAAGGACCTCTGTCTCTCAGGTCAGTATGTCAGCTCTTAATCATCTGAAATTTA
	1089 gsu1, 1100 xho11, 1134 dra1,
11141	LysLYsGluAsnIleTyRAspPheGlyLysTyRAsnGlyLysPhe Asp LeuSer ARAAAGAAATATTTATGACTTTGGTATATACATGGAATTCASGTGACMGCTTAGC YTTTTCCTTTTATAAATCTGAACACCTATTATGTACCTTTTAAGTACTGACAGAAATTA
	1130 SSP1, 1199 BSSH11,
1201	AlaProAsnLeuGluTyRSerLeuAspAlaIleArg ValAspLYsLYsAspLYsSer SGCGCAATTTAGATATAGCTTAGATGCGCAAGGCAAGTGTGATAAAAGATATATCA CGCGGTTTAAATCTTATATCGGATCGATCAGCCGCTCCGTACCACTATTTTCTATTAGT
1261	IleIleLeu ProLYsArgLeuGluIleLYsAspLYsCysTyrGlyAspAsp Tyr ATAATTTTAAAGCCACCGCTCTGAATTTAAGATAAAATGCTGGGAGCATGATATAT TATTAATATTCGGGATGCGGAACTTTAATTTCTATTACAAACCCCTACTAAATATA
1321	ThrArgTyRLYsArgGDC Tyr LeuDC LysLYsGlyPheLeuAsnOP GlnAspLeu ACCGAGTACAAAGATATAT78CTGTGAAAGAGGAGTCTTAAATTCACAGCATTA TGGTCTATGCTTTCTATTATAGACACATTTTCTCCCTAAGAAATTTAACTGTCTCAAT
	1332 SSP1, 1353 ASP700, 1377 dra1,
1381	LysLYsGly LysIleAspLeuProAsnIleAsnGlnIleLeuLYsProAsnIle ARAAAGGACSAATATATGATCTCTCTATATCATATAGCAATTTTAAACCGCAATTT TTTCTCTGATTTTAACTAGAGGGATATATAGTATAGTTCGTTTAAATTTGGCTTATA
	1425 dra1, 1435 SSP1,
1441	TyrHisPheLeuLYsLYsValLYsLYsAsnLYsGlnAsnAH ThrMetValIleSerOC TACCATTTTGAAGAAGGTAAAGACAGACAGAAATTAGCTATGCTATATATCTTAA ATGGTAAAAACCTTTTCCATTTCTCTCTGTTTAACTCTGATACCATATAGAAAT
	1470 tch112,
1501	IleHisIleIleLeuAsnLeuProLYs LysLeuArgLeuPheLeuLYsGlyIleLYs ATCCATATATACTCAACTTCCACAGATAGATTCAGGCTCTTTTAAAGGGAAATAAA TAGGTATATATGATTGAACGGTTTCSACTTCAACTCCGAGAAATTTGCCITATTT
	1545 dra1,
1561	ThrLYsLYsSerIleLYsHisIleGluMetProMetAsnSerGly LeuAsn ACCAAGAAATATACAGCACTTGTTGAATTTAGCTATGATTCGGGCTTTTAA TGGTCTTTAGATATCTGTAACCTCTTAAATACGATATTAAGCCCGGAAATTA
	1575 tch112, 1602 ECDRI, 1614 dra1,
1621	ProCysLeuIleProGluGlnGlu PheSerIleLeuLYsLYsLeuIleSerLYsLYs CGGCTCTAATCTTGAACAGAGAGGASATTCAGATCTTCAAAAGCTGATATCAAGAT GGACCAAAATTAAGGACTTGTCTTATATATGAGGACTTTTTCGACTATAGGTTTCA
	1648 ECDry,
	LeuGlnAsnIleLeuAsnLYsPheLYsMetGly AsnSerValLeuAsn ProGln



## 第1頁の続き

## 優先権主張

②1989年4月7日③米国(US)④334,586

②1989年4月21日③米国(US)④341,968

## ②発明者

エミリー ブルツクス アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ビノール, ライジン  
グ グレン 1115番地

## ③発明者

キヤロル ロリー アメリカ合衆国, カリフォルニア州, バロ アルト, フォ  
レスト アベニュー 661番地

## 手続補正書

平成2年 6月27日

特許庁長官 吉田 文 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第165503号
2. 発明の名称 発現伝播体を有する組成物
3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
名称 エム エル テクノロジー ベンチャーズ,  
エルビー
4. 代理人  
住 所 東京都港区新橋3丁目3番14号  
田村町ビルディング  
電話(503)2821(代)  
氏 名 (6606)弁理士 丹 羽 宏 之
5. 補正命令の日付 平成2年6月26日(発送日)
6. 補正の対象 図面
7. 補正の内容 別紙のとおり  
適正な用紙を用いて十分に濃厚な黒  
色で鮮明に描いたもの(第6, 12  
~15, 17, 21, 22, 及び第  
32~34図)

